



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



YARA KÁTIA SANTOS RODRIGUES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE PARASITOS
Leishmania sp. DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
(LTA) ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

João Pessoa – PB

2012



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



YARA KÁTIA SANTOS RODRIGUES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE PARASITOS
Leishmania sp. DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
(LTA) ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e Molecular do
Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
**MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

Co-orientadora: Profa.Dra. Maria Norma Melo

João Pessoa – PB

2012



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



YARA KÁTIA SANTOS RODRIGUES

Dissertação de Mestrado avaliada em 31/08/2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Orientador/a

Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano
Escola Técnica de saúde/ Centro de ciências da Saúde da Universidade Federal
da Paraíba
Examinador/a Externo/a

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
Examinador/a Interno/a

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
Suplente

Aos meus pais e queridos irmãos.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa
mais preciosa que temos”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, em especial aos meus queridos pais, que mesmo distantes são os principais responsáveis, por todo esse processo acadêmico que venho vivenciado e que de diversas formas contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado. E aos meus irmãos Sara e Dany, duas pessoas maravilhosas, que embora também distantes, sempre que possível, me enviam palavras de alento e que fazem de mim uma irmã cada vez mais apaixonada;

À minha orientadora, Márcia, pela confiança, dedicação e apoio fundamental durante a realização deste trabalho e pela convivência durante esses quase seis anos de laboratório. Obrigada Márcia pelos inúmeros ensinamentos, pelos “puxões de orelha”, pela paciência e disponibilidade que você demonstrou não apenas comigo mas com todos do laboratório, como ótima profissional que você é. Obrigada por me ajudar a ampliar meu olhar sobre a ciência e sobre a vida;

Às minhas colegas, parceiras e amigas Francianne e Patrícia, pelos seis anos de excelente convivência no laboratório Biologia de *Leishmania* sp. Foi uma bênção sem tamanho igual conhecer vocês e ter o privilégio de compartilhar tantos momentos com as duas. Momentos esses de estudo, experimentos intermináveis, fracassos, sucessos, carinho, stresse, cansaço, enfim: sermos as “Leishgirls” como um todo. Uma das coisas que mais sentirei saudades ao terminar essa pós-graduação e retornar à Cabo Verde, será certamente a companhia de vocês;

Às técnicas dona Alda, e Teresa Cristina, e Itacio, pelo auxílio dado em todos os momentos que precisei, e em especial à D. Rosângela, pela amizade e confiança depositadas em mim e pelos momentos de descontração proporcionadas no laboratório. E ao Sr. Moreira pela sempre pronta disposição em ajudar com diferentes tarefas no laboratório;

À Crispim, do Biotério Thomas George (LTF/UFPB), pelo apoio na disponibilidade do sangue e pela amizade;

À professora Dr. Norma Melo, por ter gentilmente aceitado fazer parte desse trabalho, como minha Co-orientadora e ter cedido espaço no seu Laboratório Biologia de *Leishmania* na UFMG onde parte dos experimentos foram realizadas, bem como pelo carinho demonstrado;

Ao pessoal do laboratório de Biologia de *Leishmania* da UFMG Greg, Paula, Nino, Isabella, e principalmente a Soraia, por me ter ensinado tudo sobre as técnicas moleculares empregadas nesse trabalho, a preparar os géis e analisa-los, bem como a amizade, momentos de convivência e confiança depositada em mim;

Ao Dr. Bruno Benedito do HULW e aos residentes de infectologia, principalmente Dra. Clarisse e Dr. Vitor por avisarem sempre que possível sobre pacientes com possíveis sintomatologias de LTA e realizarem as biópsias;

Ao Dr. Martin, D. Teresinha do Município de Pilões por nos ter recebido, durante as visitas ao local e visitar os pacientes com casos de LTA. E ao prof. Dr. Lúcio, por nos ter acompanhado, nas visitas ao município de Pilões, pela convivência e pelas conversas sobre leishmaniose;

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial a todos os professores pela contribuição na minha formação e a secretária Ludmila pela amizade;

Aos professores membros da banca examinadora (Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano, Prof. Dr. Sávio Torres de Farias, Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior) pela disponibilização em contribuir para o enriquecimento deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos Renata, Priscilla, Bruno, Edinaldo, Anderson, John, Felipe, Máx, Gilmara, Sara, pelo ótimo relacionamento e por estarem sempre presentes em minha vida. E especialmente á Laís e Rafael que são amigos excepcionais.

À todos os colegas de mestrado pelos momentos de aprendizado e de convivência e pelos momentos de discussão de artigos principalmente a Guilherme, Danielle e Tarcísio;

À Aracy, Raquel, Darlene, Charlyne, Nadilsa e Fatú, minhas irmãs da vida, que convivem diariamente comigo e com quem pude contar durante todos esses anos de convivência. E á Gilma, Carla e Lucy minhas eternas amigas.

À todos os meus amigos conterrâneos cabo-verdianos, guineenses, angolanos, moçambicanos, Burkina fasense, congoleses, principalmente a Nuno, Engels, Júnior, João Paulo, Reginaldo, pessoas extraordinárias que só acrescentaram a minha vida;

À todos os que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho;

E finalmente um agradecimento principal a Deus por me iluminar e guiar nos momentos de aprendizagem e por tudo que me permitiu realizar na vida;

RESUMO

RODRIGUES, Y. K. S.. 2012. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de parasitos *Leishmania* sp. de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba.**Dissertação (Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2012).

As leishmanioses são um complexo de doenças infecto-parasitárias endêmicas em 88 países que constituem um grave problema de saúde pública. Diversas espécies do gênero *Leishmania* são os agentes causadores da doença, dentre elas a espécie *L. (V.) braziliensis* associada a diferentes quadros clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana. No presente trabalho foram obtidos nove isolados de *Leishmania* sp. oriundos de LTA, sendo sete isolados (87%) oriundos de pacientes residentes no município de Pilões, um (13%) da cidade de João Pessoa, ambas regiões, do estado da Paraíba. Todos os nove isolados foram identificados como sendo da espécie *L. (V.) braziliensis* através de PCR específica. As análises de caracterização molecular pela técnica de RAPD-PCR mostraram que esses isolados compartilharam 62,63% revelando diferenças genotípicas entre elas. Contudo, os isolados AF e JSL, ambos provenientes de lesões disseminadas, tiveram o maior percentual de bandas compartilhadas dentre os isolados. Outra técnica molecular utilizada foi o SSR-PCR com o iniciador K7 que também foi capaz de demonstrar polimorfismo entre os isolados. Nas análises de PCR-RLFP das regiões ITS1, foram encontradas perfis diferentes entre os isolados, onde MRSS, JMTS, AF, JCTS, JRL apresentaram o mesmo perfil de bandas e os isolados JSL, JCNS, MFTS e JAS tiveram, cada um, perfis de bandas distintos. Na análise de PCR-RLFP da região do gene *hsp70*, JSL, AF, JCTS, JRL, MFTS apresentaram o mesmo perfil de bandas e os isolados, MRSS, JMTS, JCNS e JAS perfis de bandas distintos. Adicionalmente foram também observadas diferenças fenotípicas entre estes isolados, visto que em dado momento de cultivo, todos apresentaram comportamento diferenciado, além de demonstrarem diferenças quanto à sensibilidade às drogas utilizadas na terapêutica das leishmanioses. Portanto estes estudos revelam que os isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos no estado da Paraíba demonstraram um significativo polimorfismo genético, revelando um alto nível de variação intraespecífica.

Palavras-chave: LTA, *L.(V.) braziliensis*, Caracterização molecular.

ABSTRACT

RODRIGUES, Y. K. S.. 2012. Isolation and phenotypic and molecular characterization of *Leishmania* sp. of patients with American cutaneous leishmaniasis (ACL) treated at University Hospital Lauro Wanderley University of Paraíba. Dissertação (Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa - PB, 2012)

Leishmaniasis is a complex of infectious and parasitic diseases endemic in 88 countries, that constitute a serious public health problem. Several species of the genus *Leishmania* are the causative agents of disease, among them the species *L. (V.) braziliensis* associated with different clinical manifestations of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). In the present study were obtained nine isolates of *Leishmania* sp. from cases of ACL. Seven isolates (87%) from patients residing in the municipalities of Pilões, and one (13%) resident in João Pessoa city, both Paraíba state regions. All nine strains were identified as *L. (V.) braziliensis* by specific PCR. Analyses of molecular characterization by RAPD-PCR showed that these isolates shared 62.63% revealing genotypic differences among them. However, the isolated AF and JSL, both from disseminated lesions had the highest percentage of shared bands among the isolates. Another molecular technique used was a SSR-PCR using the K7 primer, and it was also able to show polymorphism between isolates. In PCR-RLFP analysis of ITS₁, different profiles were found among isolates, MRSS, JMTS, AF, JCTS, JRL showed the same band profile and the isolates JSL, JCNS, MFTS and JAS have each had, profiles different band. The analysis of *hsp70* gene region by PCR-RLFP revealed that the isolates JSL, AF, JCTS, JRL, MFTS showed the same band profile and the isolates, MRSS, JMTS, JCNS and JAS had each one, different profiles band. In addition were also observed phenotypic differences between these isolates, since at a given time of cultivation, all showed different behavior, and demonstrate differences in sensitivity to drugs used in the treatment of leishmaniasis. Therefore, these studies show that the isolates of *L. (V.) braziliensis* obtained in the state of Paraíba demonstrated a significant genetic polymorphism, revealing a high level of intraspecific variation.

Key words: ATL, *L. (V.) braziliensis*, Molecular characterization

LISTA DE ABREVIATURAS

DIC – Departamento de doenças infecto-contagiosas
FN – Isolado de *Leishmania (Leishmania) major* (MHOM/IL/1980/FN)
JP15 – Isolado de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MCAN/BR/99/JP15)
LT – Leishmaniose Tegumentar
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LV – Leishmaniose Visceral
LC – Leishmaniose cutânea
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LCDS – Leishmaniose cutânea disseminada
M2903 – *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903)
M1176 – Isolado de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1970/ M1176)
M5956 – Isolado *Leishmania (Viannia) naifi* (MHOM/BR/ 1980/ M5956)
M6426 – Isolado de *Leishmania (Viannia) lansonii* (MHOM/BR/ 1981/ M6426)
NNN – Meio sólido Novy, McNeal e Nicolle
PH8 – Isolado de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/IFLA/BR/67/PH8)
PCR – Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
Sb^{III} – antimonial trivalente
Sb^V – antimonial pentavalente
SVS – Secretaria de vigilância sanitária
HULW – Hospital Universitário Lauro Wanderley
WHO – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Classificação taxonômica de *Leishmania*, sp. Fonte: BRASIL, 2010.....**25**
- Figura 2** – Micrografia da morfologia do parasito. Fonte: Do Monte, R. A., 2006; Murray et al., 2005. Setas pretas indicando formas promastigotas (A) alongadas e flageladas e de amastigotas (B) formas não flageladas dentro de macrófagos peritoneais.....**26**
- Figura 3** – Vetores e reservatórios do parasita *Leishmania* sp. Fonte: Rodrigues, Y. K., 2012; BRASIL, 2010; <http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/disease/phlebotomus-papatasi/diseases/index.html>; Brasil, 2010. Hospedeiros invertebrados (*Lutzomia longipalpis* do novo mundo e *Phlebotomus papatasi* no velho mundo) (A). Hospedeiros vertebrados (raposa *Dusicyon vetulus*, gato (*Felis silvestris catus*), cão (*Canis lupus familiaris*) e o homem (*homos sapien*) (B).....**28**
- Figura 4** – Ciclo biológico do parasita *Leishmania* sp.**29**
- Figura 5** – Distribuição das formas clínicas viscerais e tegumentares das leishmanioses. Fonte: Modificado de WHO, 2012. Mapa da distribuição geográfica das leishmanioses visceral (●) e tegumentar (●) com notificações dos anos de 2005-2009. O diâmetro dos círculos representa a média do número de casos notificados. Os dados variaram entre <1000 á ≥ 25.000.....**31**
- Figura 6:** Manifestações clínicas da LT. Fonte: BRASIL, 2007a; BRASIL, 2006). Forma cutânea simples localizada, com lesão única, ulcerada, de fundo granuloso, com base eritematosa e infiltrada (A). Forma cutânea difusa com quadro de evolução crônica e sem respostas terapêuticas (B). LTA. Forma mucocutânea, com infecção secundária e destruição parcial da região nasolabial (C). Forma disseminada ocorre provavelmente por disseminação hematogênica ou linfática do parasito, caracterizada por lesões cutâneas numerosas ulceradas e podem ter diversos tamanhos (D). Leishmaniose visceral, Fase aguda, caracterizada pela presença de febre (inferior a quatro semanas), palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (E).....**32**
- Figura 7** – Casos de LTA por faixa etária de acordo com a forma clínica no estado da Paraíba Fonte: Brasil, 2010b (SINAN/SVS/MS).....**36**
- Figura 8** – Estruturas químicas das drogas referência utilizados na terapêutica das leishmanioses. Fonte: Croft et al., 2003. Sb^V, antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) a droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (A). Anfotericina B[®], formulação lipídica utilizada como droga de segunda preferência no Brasil (B).....**38**
- Figura 9** – Esquema geral de todo o procedimento experimental utilizados no presente estudo. Fonte: Rodrigues, Y. K.S., 2012.....**51**
- Figura 10** – Esquema representativo da região amplificada pelo iniciador CAA (CT) conhecido como K7. Modificado de Gontijo et al., 2001.....**58**

Figura 11 – Organização do locus do rDNA dos tripanossomatídeos. Subunidades conservadas SSU (subunidade menor) e LSU (subunidade maior) subunidade variável: ITS1 e ITS2. Modificado de Alvarenga, A. C., 2011.....**61**

Figura 12 – Organização da região do gene *hsp70* do DNA amplificada com os iniciadores *hsp70* REV e *hsp70* FOR. Rodrigues, Y. K. S., 2012.....**63**

Figura 13 – Avaliação da atividade antipromastigotas de espécies de *Leishmania* sp. Modificado de Do Monte-Neto, R. L., 2006.....**68**

Figura 14– Município de Pilões, no estado da Paraíba. Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Paraiba_Municip_Piloes.svg; Rodrigues, Y. K. S., 2012; Castellano, L. R. C., 2010. Mapa do estado da Paraíba com destaque em vermelho para o Município de Pilões (A). Algumas regiões visitadas no município de Pilões (A, B, C e D), onde residem 87,7% dos pacientes dos quais os parasitos foram isolados e estudados. Localizado na Mesorregião do Agreste Paraibano, possui vegetação abundante, várias plantações de bananeiras, mangueiras e coqueiros.....**72**

Figura 15 – Lesão mucocutânea do paciente JCNS durante a realização da biópsia na região nasal. Fonte: Castellano, L. R. C., 2010. As figuras A e B mostram a lesão na região da cavidade nasal que apresenta coloração avermelhada intensa e que se encontra num estágio de perda parcial do septo nasal.....**75**

Figura 16 – Lesões cutâneas localizadas do paciente MRSS, durante a realização da biópsia. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2011. A figura representa as duas lesões cutâneas com aspecto avermelhado, com bordas elevadas e de fundo granulomatoso.....**75**

Figura 17 – Lesões cutâneas disseminada do paciente AF. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2011; Neris, P. L., 2011. A figura representa algumas das várias lesões que o paciente apresentou, distribuídas entre a cabeça, membro superior e inferior. Lesões ulceradas de tamanhos variados, com bordas elevadas e crostas no membros inferiores (A e B); Lesões ulceradas de tamanhos variados, com bordas elevadas nos membros superiores (C, D).....**76**

Figura 18 – Gel de poliacrilamida á 5% mostrando a amplificação das amostras estudadas com os iniciadores B1/B2 específicos para espécies do complexo *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); Isolados 1-9; Cepas de referência 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12-FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- CN: controle negativo (sem DNA).....**79**

Figura 19 – Gel de poliacrilamida á 5% mostrando a amplificação das amostras estudadas com os iniciadores M1/M2 específicos para espécies do complexo *L. (L.) amazonensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); Isolados 1-9; Cepas de referência: 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12- FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- CN = controle negativo (sem DNA).....**80**

Figura 20 – Figura 19: Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L.(V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador P14 em gel de poliacrilamida á 5%. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10- Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*);

14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN-controle negativo (sem DNA).....82

Figura 21 – Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador P14. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....82

Figura 22 – Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador M13F-40 em gel de poliacrilamida á 5%. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN-controle negativo (sem DNA).....83

Figura 23 – Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador M13F-40. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados..... 84

Figura 24 – Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador L15(996) em gel de poliacrilamida á 5%. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN-controle negativo (sem DNA).....85

Figura 25 – Fenograma gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador iniciador L15(996). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap* ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....85

Figura 26 – Figura 25: Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L(V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador P53 em gel de poliacrilamida á 5%. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN-controle negativo (sem DNA).....86

Figura 27 – Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador P53. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*).

(*L. amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naiffi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....87

Figura 28 – Fenograma consenso gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores, P14, M13F-40, L15(996) e P53. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naiffi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....88

Figura 29 – Perfil de SSR-PCR de DNA genômico dos isolados de *L. braziliensis* estudadas, com o iniciador K7 em gel de poliacrilamida a 5%. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb Invitrogen; 1- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10; Isolados 11- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 12- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 13- M5956 (*L. (V.) naiffi*); 14- M8408 (*L. (V.) shawi*); 15- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 16- FN (*L. (L.) major*); 17- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 18- CN-controle negativo (sem DNA).92

Figura 30 – Fenograma gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de SSR-PCR com o iniciador iniciador K7. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naiffi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....93

Figura 31 – Fenograma consenso gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de RAPD e SSR-PCR. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naiffi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....96

Figura 32 – Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação da região ITS-1 do rDNA dos isolados de *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: Marcador Molecular (100pb Promega); 1-9 Isolados; 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naiffi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN: controle negativo (sem DNA).97

Figura 33 – Perfil de restrição da região ITS-1 do rDNA dos isolados de *L. (V.) braziliensis* com Hae III em gel em poliacrilamida (5%). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: Marcador Molecular (50pb Promega); 1-9 isolados; 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*), 12- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 13- FN (*L. (L.) major*), 14- PH8 (*L. (L.) amazonensis*), 15- M1176 (*L. (V.) guyanensis*), 16- M6426 (*L. (V.) lansonii*), 17- M5956 (*L. (V.) naiffi*), M8408 (*L. (V.) shawi*), 18- CN: controle negativo (sem DNA).98

Figura 34 – Fenograma gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de PCR-RFLP, do ITS-1 do rDNA digerida por HaeIII. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap* ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*);

PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). Isolados.....**99**

Figura 35 – Gel de agarose (1%), mostrando a amplificação da região hsp70 dos isolados de *L.(V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: marcador molecular 1kb Invitrogen; 1-9 Isolados; 10- Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: marcador molecular 1kb Invitrogen; 1-9 Isolados; 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*), 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12- FN (*L. (L.) major*), 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*), 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*), 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*), 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8401 (*L. (V.) shawi*); 18- CN: controle negativo (sem DNA).**100**

Figura 36 – Perfil de restrição da região hsp70 do DNA gênomico dos isolados de *L. braziliensis* com BstUI em gel de poliacrilamida (5%). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: Marcador Molecular (50pb Promega), 1- SC: Banda amplificada com os iniciadores p/ ITS1 sem corte com a enzima; 2- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 3- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 4- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 5- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 6- M5956 (*L. (V.) naifi*); 7- M8401 (*L. (V.) shawi*); 8-17 isolados; 18- CN: controle negativo (sem DNA).....**101**

Figura 36 – Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de PCR-RFLP da região hsp70 digerida pela enzima BstUI. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap* ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.....**102**

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Cepas de Referência da OMS, utilizadas no presente estudo. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. * A cepa JP15 incluída nessa tabela é uma cepa caracterizada pelo grupo como *Leishmania chagasi*53
- Quadro 2** – Iniciadores específicos utilizadas para a identificação de *Leishmania* sp. nas amplificações pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....55
- Quadro 3** – Reagentes utilizados nas amplificações específicas para a identificação de *Leishmania* sp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....56
- Quadro 4** – Ciclo de amplificação utilizada para a PCR específica para a identificação de *Leishmania* sp. com os iniciadores B1/B2 e M1/M2. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....56
- Quadro 5** – utilizados na reação de RAPD-PCR para todas as amostras de *Leishmania* sp. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....57
- Quadro 6** – Reagentes utilizados na reação de RAPD-PCR para todas as amostras de *Leishmania* sp. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....57
- Quadro 7** – Ciclos de amplificação utilizada nas reações de RAPD-PCR. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....58
- Quadro 8** – Iniciador utilizado na amplificação pela reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....59
- Quadro 9** – Reagentes utilizados na amplificação pela reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012...59
- Quadro 10** – Ciclo de amplificação utilizado na reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....60
- Quadro 11** – Iniciadores utilizados nas amplificações da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS1. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....61
- Quadro 12** – Reagentes utilizados nas amplificações da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS1. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....61
- Quadro 13** – Ciclo de amplificação da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS1. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....62
- Quadro 14** – Iniciadores utilizados para a reação de cadeia de polimerase para a região *hsp70*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....63
- Quadro 15** – Reagentes utilizados no preparo do mix para reação de cadeia de polimerase para a região *hsp70*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....63

Quadro 16 – O ciclo de amplificação para a região <i>hsp70</i> . Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	64
Quadro 17 – Componentes do gel de poliacrilamida. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	65
Quadro 18 – Características dos pacientes com leishmaniose tegumentar dos quais foram obtidos isolados de <i>Leishmania</i> sp. (M: masculino, F: feminino). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	71
Quadro 19 – Forma clínica e características das lesões dos pacientes com leishmaniose envolvidos no estudo. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	74
Quadro 20 – Tratamento e resposta dos pacientes com diferentes formas clínicas de LT. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	78
Quadro 21 – Compartilhamento de bandas de DNA entre as cepas de <i>Leishmania</i> sp. Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, M13F-40, L15 e P53. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	90
Quadro 22 – Compartilhamento de bandas de DNA entre as cepas de <i>Leishmania</i> sp. Resultados obtidos com a técnica SSR-PCR com o iniciador K7. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	95
Quadro 23 – Médias do número de bandas compartilhadas entre os isolados de <i>L. braziliensis</i> na técnica de RFLP-PCR, com os iniciadores LITSR/ L5.8S. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	99
Quadro 24 – Média do número de bandas compartilhadas entre os isolados de <i>L. braziliensis</i> . Resultados obtidos com a técnica de RFLP-PCR, da região <i>hsp70</i> com os iniciadores hsp70 for/ hsp70 rev . Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Curva de crescimento dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudados e da cepa de referência M2903 (*L. braziliensis*). Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Estes dados representam a média de duplicata de um experimento.....**104**
- Gráfico 2** – Atividade antipromastigota do antimônio pentavalente (Glucantime - Sb^V), sobre a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e os isolados de *L.(V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (1x10⁶ células/mL) foram cultivados em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C. O gráfico representa à média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para comparar as diferentes concentrações, foi o teste “t” foi sendo * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).**105**
- Gráfico 3** – Concentração do antimônio pentavalente (Glucantime - Sb^V) que inibe 50% do crescimento (IC₅₀) da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e dos isolados de *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Para análise estatística foi utilizado o teste “t” para comparação entre as amostras, sendo ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação a cepa de referência)**106**
- Gráfico 4** – Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (Sb^{III}), sobre a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e os isolados de *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (1x10⁶ células/mL) foram cultivados em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C. O gráfico representa à média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para comparar as diferentes concentrações, foi o teste “t” foi sendo * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).**107**
- Gráfico 5** – Concentração do antimônio trivalente (Sb^{III}) que inibe 50% do crescimento (IC₅₀) da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e dos isolados de *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Para análise estatística foi utilizado o teste “t” para comparação entre as amostras, sendo * $P \leq 0,05$ (Significância em relação a cepa de referência).....**108**
- Gráfico 6** – Atividade antipromastigota da Anfotericina B, sobre a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e os isolados de *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (1x10⁶ células/mL) foram cultivados em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C. O gráfico representa à média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para comparar as diferentes concentrações, foi o teste “t” foi sendo * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).....**109**
- Gráfico 7** – Gráfico 7: Concentração do antimônio trivalente (Sb^{III}) que inibe 50% do crescimento (IC₅₀) da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e dos isolados de *L. (V.) braziliensis*. Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Para análise estatística foi utilizado o teste “t” para comparação entre as amostras, sendo * $P \leq 0,05$ (Significância em relação a cepa de referência).....**110**

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Número de bandas de DNA de amostras de *Leishmania* spp. detectadas por RAPD - PCR, entre **150 a 1650** pb com os iniciadores M13F-40, P14, P53, L15(966).....**91**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Leishmanioses: classificação e seus agentes etiológicos.....	23
1.2. Epidemiologia e formas clínicas das leishmanioses.	29
1.3. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil	34
1.4. Leishmaniose tegumentar (LTA) na Paraíba.	35
1.5. Tratamento das leishmanioses.....	36
1.6. Diagnóstico das leishmanioses	39
1.7. Material Genético da <i>Leishmania</i> sp.....	40
1.8. Técnicas moleculares com uso de DNA na identificação e caracterização de <i>Leishmania</i> sp.....	42
1.9. justificativa	46
2. OBJETIVOS	49
2.1. OBJETIVO GERAL.....	49
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1. Origem dos pacientes com LTA	52
3.2. Análise clínica dos pacientes e diagnóstico parasitológico	52
3.3. Isolamento dos parasitos.....	53
3.4. Cepas de referências de <i>Leishmania</i> sp.....	53
3.5. Parasitos e a sua manutenção	54
3.6. Extração de <i>Leishmania</i> sp.....	54
3.7. Identificação de <i>Leishmania</i> sp. através de PCR específica.....	55
3.8. Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR)Erro! Marcador não definido. 6	
3.9. Reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR)	58
3.10. PCR-RFLP da região ITS 1 rDNA	60
3.11. PCR-RFLP da região do gene <i>hsp70</i>	62
3.12. Análise em gel de agarose	64
3.13. Análise em gel de poliacrilamida	65
3.14. Análise dos resultados de RAPD/PCR, SSR-PCR e PCR-RFLP e construção dos fenogramas.....	66
3.15. Análise do crescimento dos isolados de <i>Leishmania</i> sp. em meio de cultura	66
3.16. Sensibilidade das formas promastigotas dos isolados de <i>Leishmania</i> sp. ao antimônio pentavalente (Glucantime), antimônio trivalente e a Anfotericina B.....	67
3.17. Análise estatística.....	68
4. RESULTADOS.....	71

4.1.	Características dos pacientes diagnosticados com LTA e isolados de <i>Leishmania</i> sp. obtidos desses pacientes.....	71
4.2.	Forma clínica de LTA nos pacientes envolvidos no estudo	73
4.3.	Resposta dos pacientes ao tratamento empregado	76
4.4.	Identificação dos isolados de <i>Leishmania</i> sp por PCR específica.....	79
4.5.	Caracterização genética dos isolados do complexo <i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i>	80
4.5.1	Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR).....	80
4.5.2	Reação em cadeia da cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequências simples (SSR- PCR).....	92
4.5.2.1	Análise associada dos resultados obtidos por RAPD-PCR e SSR-PCR.....	96
4.5.3	PCR-RFLP.....	97
4.5.3.1.	Amplificação e digestão da região ITS-1 de rDNA (PCR-RFLP / HaeIII)	97
4.5.4	Amplificação e digestão da região <i>hsp70</i> (PCR-RFLP/ BstUI).....	100
4.6.	Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Leishmania braziliensis</i>	103
4.6.1.	Perfil de crescimento das formas promastigotas dos diferentes isolados de <i>L. braziliensis</i> em meio de culturas.....	103
4.6.2	Sensibilidade dos isolados de <i>Leishmania braziliensis</i> a das drogas de referência.....	104
5.	DISCUSSÃO	112
6.	CONCLUSÃO.....	126
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
	ANEXOS	147

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Leishmanioses: classificação e seus agentes etiológicos

Estima-se que cerca de 1.5 a 2 bilhões de pessoas ao redor do mundo sofrem com uma ou mais doenças consideradas negligenciadas (WHO, 2012). Essas são um grupo de 13 doenças infecciosas crônicas que matam ou deixam sequelas desfigurantes causadas por diversos agentes a exemplo de protozoários (CAMARGO et al., 2008; WHO/NTD, 2004; WHO, 2012). Endêmicas em 88 países, as leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, e estão na sexta posição nesse grupo de parasitoses que são negligenciadas (WHO, 2012; DESJEUX, 2004).

As leishmanioses abrangem principalmente países incluídos no mapa sócio-econômico da pobreza pelo mundo (ALVAR et al., 2012; WHO, 2012). Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas e que 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente, além de cerca de 350 mil viverem em risco de serem contaminadas (WHO, 2012; DESJEUX, 2004; GOTO; LINDOSO, 2012). Essas enfermidades distribuem-se em quatro continentes em regiões tropicais e subtropicais do velho e do novo mundo não tendo sido registrado apenas na Oceânia (RETHINGER et al., 2007, ALVAR et al., 2012; GOTO; LINDOSO, 2012; WHO, 2012).

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A diversidade específica do gênero *Leishmania* é considerável, com pelo menos 20 espécies patogênicas ao homem (FRAGA et al., 2010). Este gênero pertence ao Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (LAINSON; SHAW, 1987). O gênero *Leishmania* é subdividido em dois sub-gêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Esses dois sub-gêneros se diferenciam devido ao local onde ocorre as fases desenvolvimento do parasita no inseto vetor, sendo no intestino médio para o subgênero *Leishmania*, e no intestino posterior para a *Viannia*. As espécies destes dois sub-gêneros foram agrupadas em complexos, como mostra a figura 1 (LAINSON; SHAW, 1987). Essa classificação de 1987 manteve-se até os dias atuais, sendo corroborada por diferentes análises moleculares, como por Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) e por sequências de DNA (CUPOLILLO et al., 2003; FRAGA et al., 2010).

Os parasitos do subgênero *Viannia* são encontrados apenas no Novo Mundo, onde causam a leishmaniose Tegumentar (LT), e são capazes de infectar muitos animais silvestres, como roedores, carnívoros, edentados e primatas (BRASIL, 2010a). A *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é a espécie mais encontrada parasitando o homem no Novo mundo (BRASIL, 2010a). Já as espécies do subgênero *Leishmania* são encontradas tanto no Novo como no Velho Mundo. (BRASIL, 2010a).

A identificação dos parasitos do gênero *Leishmania* baseia-se em características intrínsecas e extrínsecas desses parasitos. Inicialmente, a identificação das espécies de *Leishmania* ocorria principalmente devido as características extrínsecas do parasito onde os parasitos eram identificados através de sua distribuição geográfica, e formas clínicas das leishmanioses (LAISON; SHAW, 1987). Contudo, atualmente a identificação baseia-se principalmente nas características intrínsecas do parasita, envolvendo estudos morfológicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos (BRASIL, 2010a).

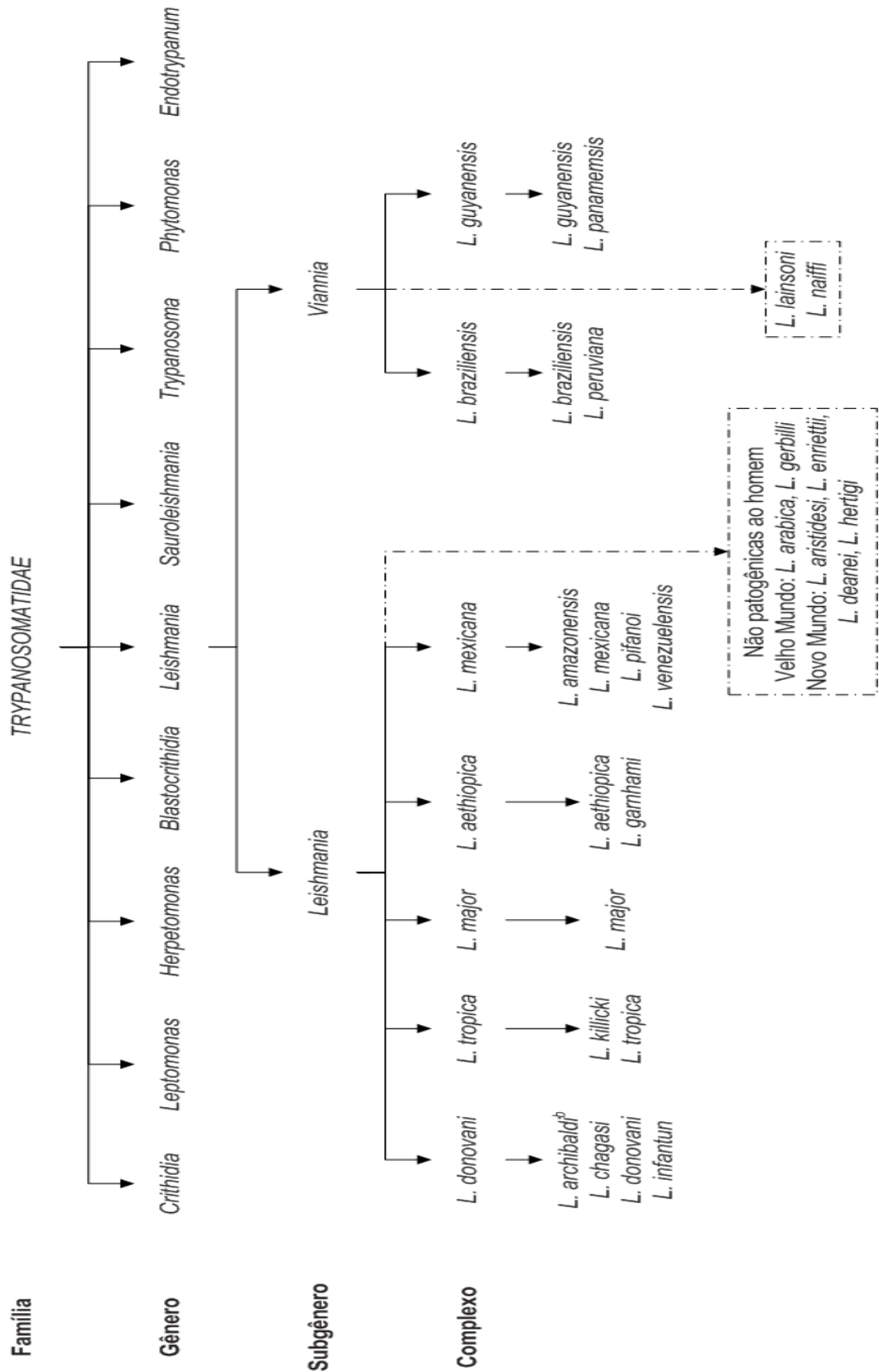
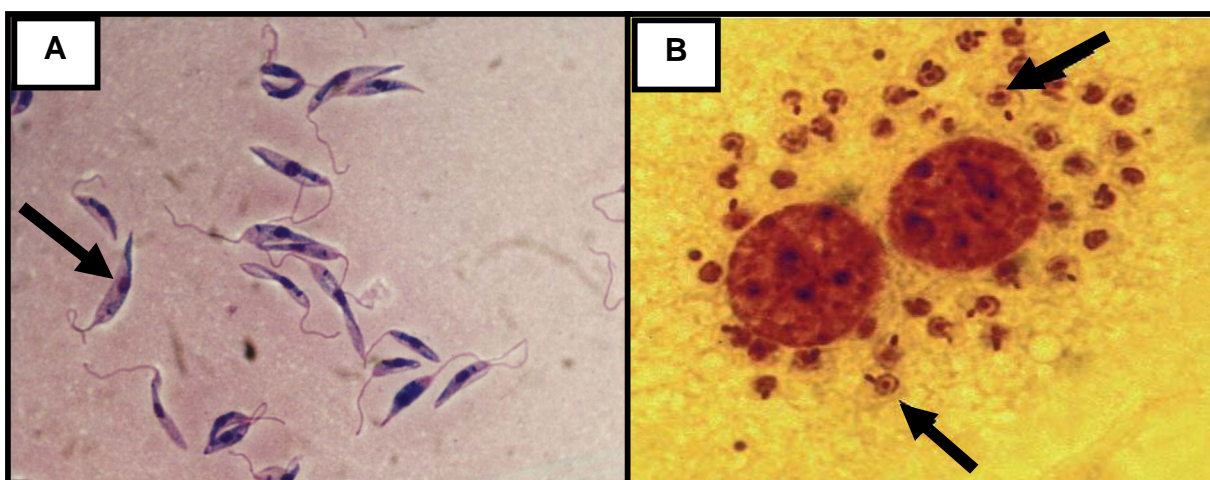


Figura 1: Classificação taxonômica de *Leishmania* sp.

Parasitas *Leishmania* sp. são digenéticos, que se encontram sob duas formas principais: promastigotas e amastigotas (Figura 2). São caracterizados por um ciclo de vida heteroxênico, onde há alternância entre dois estágios morfológicos, um no hospedeiro vertebrado (exemplo do homem e outros mamíferos) e o outro estágio no hospedeiro invertebrado (inseto) (KILLICK-KENDRICK, 1999; GOTO; LINDOSO, 2012).

Figura 2: Micrografia da morfologia do parasito.



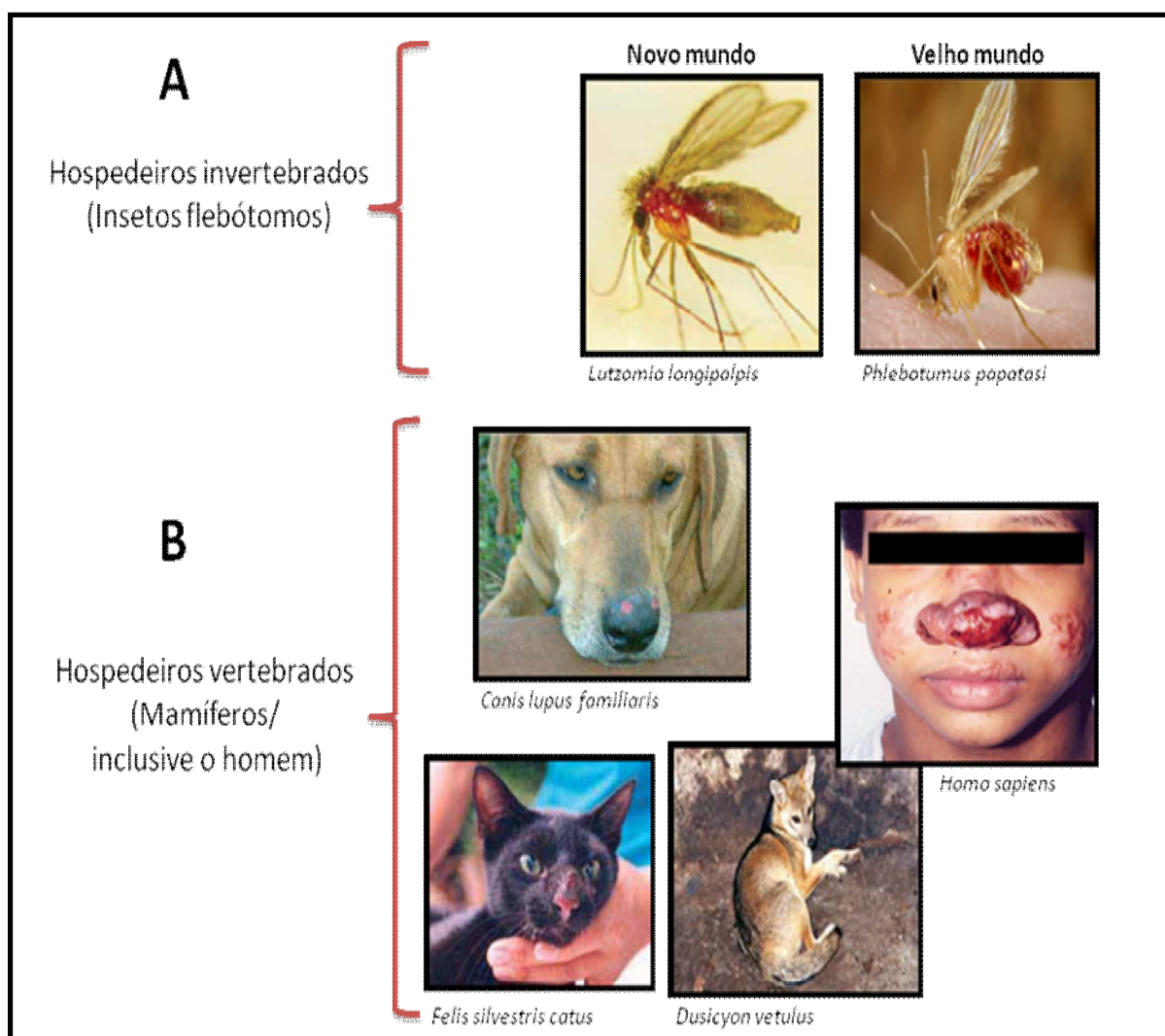
Fonte: Do Monte, R. A., 2006; Murray et al., 2005. Setas pretas indicando formas promastigotas (A) alongadas e flageladas e formas amastigotas (B), não flageladas, no interior de macrófagos.

As formas promastigotas são alongadas e flageladas, com o corpo variando de 5-20 μ m, por 1,4 μ m, com o flagelo livre anterior com cerca de 20 μ m de comprimento. Estas formas se desenvolvem extracelularmente no hospedeiro invertebrado, os insetos flebótomos. A principal forma de transmissão da doença é durante o repasto sanguíneo de flebótomos fêmeas, pois estas são hematófagas e com isso necessitam de sangue para a nutrição e maturação dos seus ovos. Com isso elas picam os seus hospedeiros mamíferos, ora ingerindo, ora transmitindo o parasita. (ANDRADE et al., 2007; KILLICK-KENDRICK, 1999). Esses insetos vetores responsáveis pela transmissão da doença são dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, sendo as espécies do gênero *Phlebotomus* prevalente no velho mundo, e *Lutzomia*, no novo mundo (Figura 3A) (ALEXANDER e RUSSEL, 1999; KAMHAWI, 2006; VANNIER-SANTOS et al., 2002; GOTO, LINDOSO, 2012).

A fase de infecção do hospedeiro vertebrado é mantida pelas formas amastigotas de *Leishmania* sp. que são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente os macrófagos. Morfologicamente, as formas amastigotas são ovalóides, com flagelo rudimentar não exteriorizado, e com o corpo variando de 2-4 μ m (BEATES, 2007). As principais células infectadas pelas formas amastigotas são os macrófagos. No entanto, outros tipos celulares têm sido descritos no envolvimento com o processo de fagocitose das formas promastigotas quando essas são inoculadas no hospedeiro, como os neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Os hospedeiros vertebrados para as espécies de *Leishmania* podem ser encontrados tanto em ambiente silvestre como doméstico. Já foram descritos vários animais reservatórios a exemplo de cães e roedores (BRASIL, 2010a; SIMÕES-MATTOS, 2005) inclusive o próprio homem, que geralmente é o menos acometida dentre as espécies citadas. Mais recentemente algumas espécies de felinos e equinos foram diagnosticados com LT. Contudo os principais responsáveis pelos casos de leishmaniose em áreas urbanas são os cães. (BRASIL, 2010a) (Figura 3B).

O ciclo biológico dos parasitos inicia-se quando o flebótomo infectado, durante o repasto sanguíneo, se alimenta do sangue no hospedeiro mamíferos na qual regurgita formas promastigotas infectantes (VANNIER-SANTOS et al., 2002; GOTO; LINDOSO, 2012) (Figura 4). Essas são primeiramente fagocitadas pelos neutrófilos que após algumas horas sofrem apoptose e são fagocitadas pelos macrófagos, que são as células definitivas para *Leishmania* (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). No interior dos macrófagos, as promastigotas transformam-se rapidamente nas formas amastigotas, que se encontram alojados nos fagolisossomos dos macrófagos, onde se multiplicam e promovem a lise da célula hospedeira. Liberadas na corrente sanguínea, as amastigotas são fagocitadas por outros macrófagos, iniciando uma reação inflamatória no local. Durante outro repasto sanguíneo, o inseto vetor não infectado ao alimentar-se do sangue de um mamífero infectado ingere as formas amastigotas, que irão sofrer um conjunto de modificações morfológicas e bioquímicas no intestino do vetor, até se transformarem em formas promastigotas infectantes, que ao serem injetadas em outro hospedeiro vertebrado tem-se a continuidade ao ciclo (VANNIER-SANTOS et al., 2002; GOTO; LINDOSO, 2012).

Figura 3: Vetores e reservatórios do parasita *Leishmania* sp.

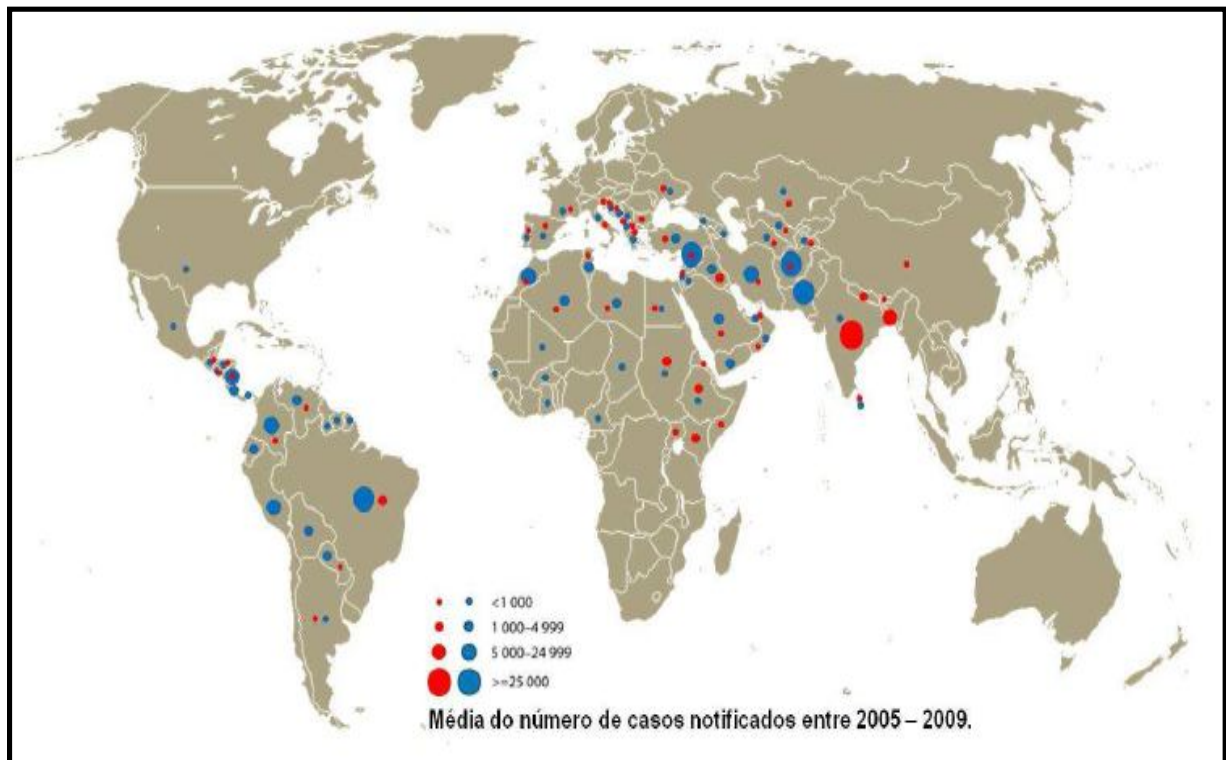


Fonte: Rodrigues, Y. K., 2012; BRASIL, 2010a; <http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/disease/phlebotomus-papatasi/diseases/index.html>; Hospedeiros invertebrados (A) (*Lutzomia longipalpis* do novo mundo e *Phlebotomus papatasi* no velho mundo). Hospedeiros vertebrados (B) (Raposa: *Dusicyon vetulus*; Gato: *Felis silvestris catus*; cão: *Canis lupus familiaris* e o homem (*homo sapiens*)).

As duas principais formas clínicas que representam as leishmanioses são a leishmaniose visceral (LV) e as formas tegumentares da doença (LT). A LV é uma forma grave da doença que acomete as vísceras (REITHINGER et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009) e cerca de 90% das incidências ocorrem no, Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Sudão e a Etiópia (ALVAR et al., 2012; WHO, 2012). Já a LT é caracterizada por infecções confinadas a derme apresenta quatro formas básicas, a cutânea localizada, cutânea difusa, disseminada a mucocutânea (SILVEIRA et al., 2008; BRASIL, 2010a) e abrange mais países. Aproximadamente 70% a 75% da estimativa de incidência de casos de LT ocorrem principalmente no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irão, Síria, Etiópia, Norte do Sudão, Costa Rica e Peru (ALVAR et al., 2012; WHO, 2012) (Figuras 5). Esses dados não tiveram muitas alterações ao longo de décadas de estudo, principalmente no Brasil e Síria, devido ao controle ineficiente de vetores, bem como aumento de casos de co-infecção, principalmente com HIV/AIDS (REITHINGER et al., 2007; ALVAR et al., 2012).

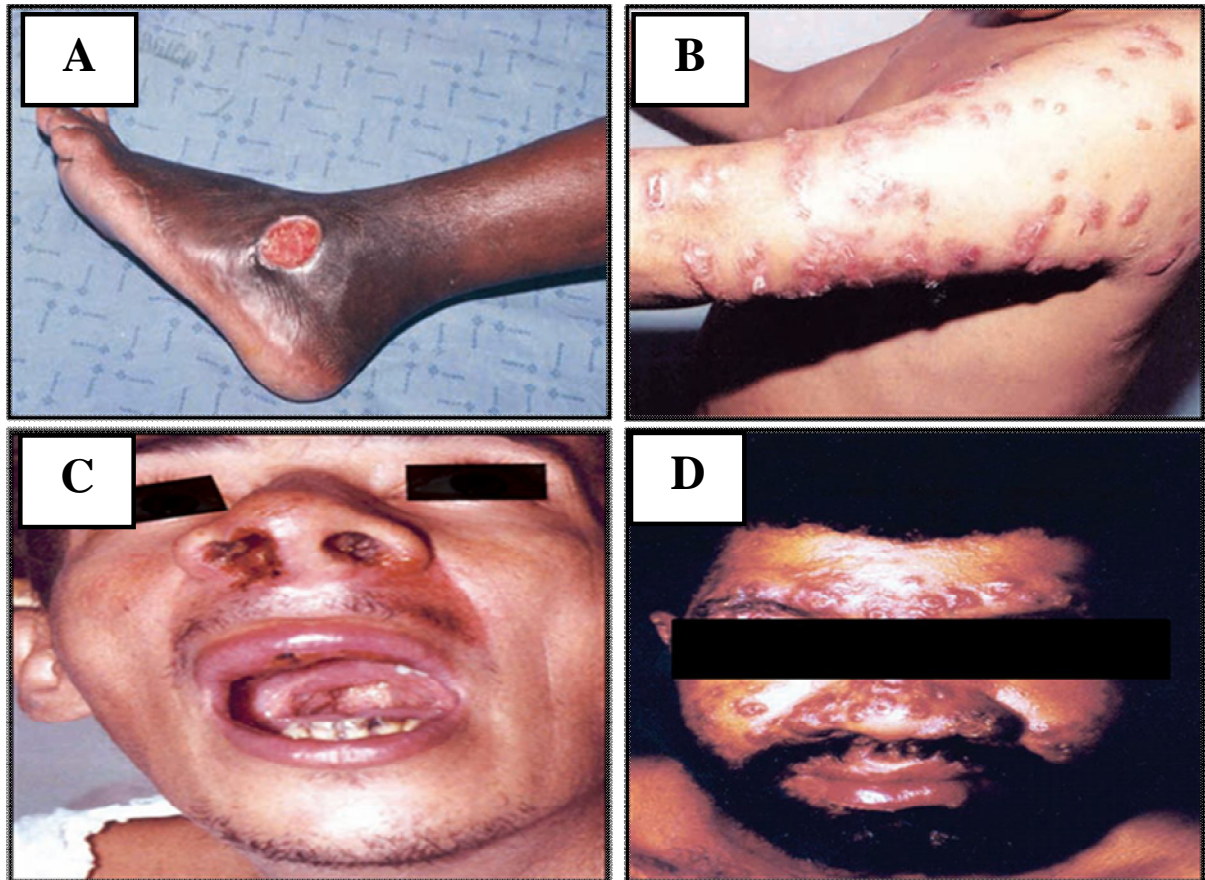
Nas Américas a leishmaniose tegumentar (LTA) foi tradicionalmente caracterizada como uma zoonose onde estaria associado com a infecção de homens que estão expostos aos ciclos de transmissão selvagem (DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2010a; GOTO; LINDOSO, 2012). Contudo nos dias atuais este padrão epidemiológico sofreu mudanças, demonstradas por um crescente número de casos de leishmaniose humana (BRASIL, 2010). Uma crescente urbanização e alteração do ecossistema aonde a transmissão ocorre é um dos principais fatores que contribuíram para a expansão da doença (DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004). Tanto a diversidade genética de parasitos do gênero *Leishmania* sp., como as características genéticas e imunológicas do hospedeiro mamífero influenciam na manifestação das formas clínicas das leishmanioses. A natureza da reposta imune tem papel fundamental na determinação da forma clínico-patológica da doença (CUNNINGHAM, 2002; ZERPA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008). Com isso as diferentes formas clínicas tegumentares da doença podem apresentar diversos níveis de formas clínicas (Figura 6).

Figura 5: Distribuição das formas clínicas viscerais e tegumentares das leishmanioses.



Fonte: WHO, 2012. Mapa da distribuição geográfica das leishmanioses visceral (●) e tegumentar (●) com notificações dos anos de 2005-2009. O diâmetro dos círculos representa a média do número de casos notificados. Os dados variaram entre <1000 a ≥ 25.000 .

Figura 6: Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA).



Fonte: BRASIL, 2007; BRASIL, 2006). Forma cutânea simples localizada, com lesão única, ulcerada, de fundo granuloso, com base eritematosa e infiltrada (A). Forma cutânea difusa com quadro de evolução crônica e sem respostas terapêuticas (B). LTA. Forma mucocutânea, com infecção secundária e destruição parcial da região nasolabial (C). Forma disseminada ocorre provavelmente por disseminação hematogênica ou linfática do parasito, caracterizada por lesões cutâneas numerosas ulceradas e podem ter diversos tamanhos (D). Leishmaniose visceral, Fase aguda, caracterizada pela presença de febre (inferior a quatro semanas), palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (E).

A leishmaniose cutânea localizada ou LCL é considerada a forma simples de lesão (Figura 6A), caracterizada por úlceras únicas ou múltiplas, confinadas a derme, com formação de típicas bordas elevadas de centro avermelhado e granuloso nas regiões de picada do inseto-vetor. Essas lesões tendem a cicatrização espontânea, mesmo sem o tratamento, com cura em alguns meses, variando do tipo de espécie de *Leishmania* envolvida (CARVALHO et al., 2006; REITHINGER et al., 2007; WHO 2010). No Novo Mundo, LCL é provocada por parasitos pertencentes tanto ao subgênero *Leishmania* como *Viannia* (BRASIL, 2010a). No Brasil já foram identificados sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas como agentes etiológicos da LC: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L.*

(*V.*) *naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (REITHINGER et al., 2007; SILVEIRA et al. 2008b; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012). Contudo na maioria dos casos de LCL, o agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis*.

A leishmaniose cutânea disseminada ou LCDS é a forma da leishmaniose que ocorre provavelmente por disseminação hematogênica ou linfática do parasito (Figura 6B). É caracterizada por lesões cutâneas numerosas e distantes do local das picadas, distribuindo-se por diversas áreas do corpo; em geral, são pequenas e ulceradas, podem ter diversos tamanhos e costumam responder bem ao tratamento (REITHINGER et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; BRASIL, 2010a; GOTO; LINDOSO, 2012). As espécies envolvidas são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, e *L. (L.) amazonensis*, sendo a primeira a mais comumente associada a esta forma clínica.

A forma mucocutânea da leishmaniose ou LMC é uma das manifestações da LT mais severas (Figura 6C), que geralmente origina-se a partir da recorrência de uma lesão cutânea simples. O agente etiológico mais associado a esta forma clínica é a *L. (V.) braziliensis*, e em alguns casos, a espécie *L. (V.) guianensis* (BRASIL, 2007). Essas lesões secundárias promovidas pelo parasito são caracterizadas pela disseminação metastática do parasito, causando danos nas mucosas e cartilagens. Uma inflamação inicial na mucosa nasal é precedida de danos no septo nasal, com formação de úlceras e perfuração, assim como possíveis acometimentos da faringe, laringe, lábios, bochechas e o palato mole. A LMC não tem cura espontânea e é de difícil tratamento, provocando altos índices de recidiva (REITHINGER et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; BRASIL, 2010; GOTO; LINDOSO, 2012).

A forma difusa ou LCD é a forma rara da LT (Figura 6D), caracterizada por lesões papulares múltiplas de aparência acneiforme, que se disseminam por várias partes do corpo. A LCD ocorre geralmente como forma de lesões cutâneas pelo corpo e posteriormente ocorre a disseminação hematogênica ou linfática do parasito por todo o corpo. Sendo caracterizada por lesões cutâneas numerosas ulceradas e os pacientes com baixa imunidade celular os mais propensos a desenvolver esse tipo de leishmaniose (CONVICT; ULRICH, 1993; SILVEIRA et al., 2008; GOTO; LINDOSO, 2012). O principal agente etiológico responsável por este tipo de manifestação clínica é a espécie *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2010a).

1.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil

No Brasil, a LTA constitui-se em uma das maiores afecções dermatológicas públicas do país, sendo já registradas em todas as 27 federações brasileiras (BRASIL, 2010a). Dados mostram que o coeficiente de casos de LTA por 100.000 habitantes no Brasil tem sido maior na região Norte, com a média do coeficiente do período 2000-2009 de 72,51, seguido da região Centro-Oeste com 30,76, o Nordeste 16,58, Sudeste 3,32 e por último a região Sul com um coeficiente de 2,54. No período de 2000-2009 o Brasil confirmou cerca de 260.573 casos de LTA. No período de 2005 a 2008 foi notificada uma diminuição de casos de leishmaniose por todas as federações, porém no ano de 2009 foi identificado um aumento da incidência da LTA (BRASIL, 2010a).

De forma geral a manifestação clínica das leishmanioses depende muito do tipo de espécie associada a infecção. No Brasil já foram identificados sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas como agentes etiológicos, porém a *L. (V.) braziliensis* é a mais implicada nos diferentes tipos de manifestações clínicas, em todas as federações tanto no norte, nordeste, sul e sudeste do país que são acometidas por essa enfermidade (SILVEIRA et al. 2008b; GOTO; LINDOSO, 2012). (ISHIKAWA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; CUPOLILO et al., 2003; BRANDÃO-FILHO, 2003; MARTINS et al., 2010).

Na região do Nordeste, no estado de Pernambuco, estudos realizados por Rodrigues e colaboradores (2002) demonstraram que dos 88 pacientes positivos para *Leishmania* todas foram classificadas como *L. (V.) braziliensis*. Resultados similares foram encontrados por outros autores que identificaram a espécie *L. (V.) braziliensis* como a mais frequentemente associada a LT no Brasil (MARTINS et al., 2010; CUPOLILLO et al., 2003; BRITO et al., 2009). Embora alguns roedores já tenham sido identificados como hospedeiros desta espécie, os principais reservatórios ainda não são bem conhecidos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

Nos estados da Amazônia, do Pará e do Acre ambas da região Norte, a espécie prevalente também é a *L. (V.) braziliensis* embora nessas regiões essa espécie seja mais heterogênea (SILVEIRA et al., 2004; TOJAL et al., 2006; CUPOLILLO et al., 2003; GOMES et al., 1995; ISHIKAWA et al., 2002). Da mesma forma em outros estados como Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo, Rio de Janeiro, que representam as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país onde a *L. (V.) braziliensis* já foi também descrita como sendo a espécie prevalente. Dados esses que foram comprovados por diferentes técnicas moleculares

(GONTIJO, 2000; THOMAZ SOCCOL et al., 2003, CUPOLILLO et al., 2003; CARVALHO et al., 2006; CASTRO et al., 2005, 2007; SILVA et al., 2010).

1.4 Leishmaniose tegumentar (LTA) na Paraíba

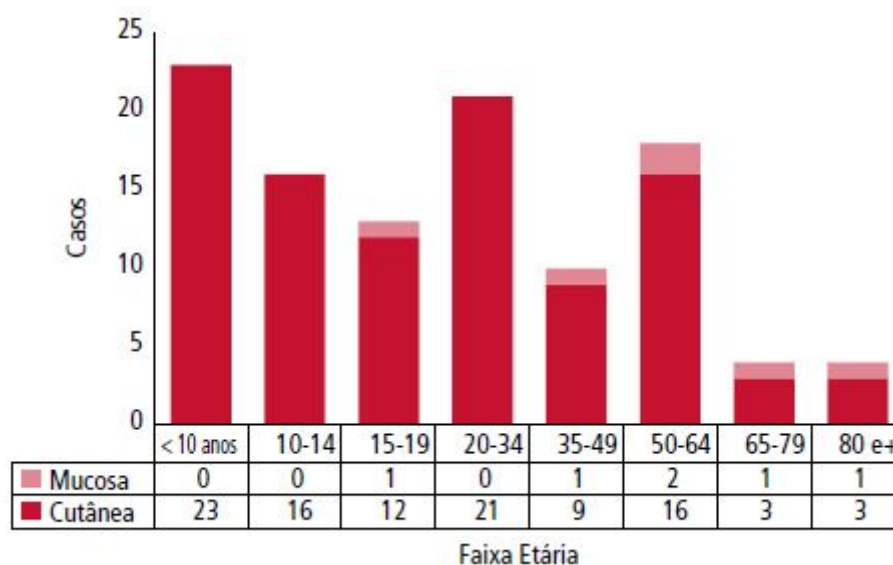
Na Paraíba, no período de 2000-2009, o número de casos registrados de LTA foi de 761 (BRASIL, 2010b). Contudo, é possível que o número real seja bem superior, devido a uma provável subnotificação dos casos. Os números de casos desde o ano de 2000 mostraram uma tendência a manter-se constante, porém, no ano de 2009, os casos notificados (109) foram quase o dobro de 2008 (53), e superiores a todas as outras notificações após o ano de 2000 (BRASIL, 2010b). Observou-se que dentre esses casos diagnosticados no ano de 2009, 48,6% foram referentes à indivíduos do sexo masculino, com idade superior a 10 anos. Quanto às formas clínicas, verificou-se que dentre os 109 casos de LTA apenas 6 correspondem a pacientes com a forma clínica mucosa e a maior incidência foi de casos de leishmaniose cutânea localizada (103 casos). O percentual de cura clínica dessas diferentes manifestações foi calculado e confirmado com base em exames laboratoriais, gerando um valor de 73 e 80,7% nas manifestações clínicas estudadas (Figura 7).

Em 2009, os cinco municípios paraibanos com maior número de casos de LTA foram Alagoa Nova (28), Areia (18), Alagoa Grande (16), Pilões (15) e Alagoinha (6). No ano de 2010, no estado, o município de Pilões, apresentou o maior número de casos com 15 notificações, seguido de Alagoa Nova (11), Matinhas (7), Areia (6) e Alagoa Grande (5) (BRASIL, 2010b). Esses dados revelam que Pilões é um dos municípios do estado que mais contribui com pacientes com casos de LTA nos hospitais de referência para o tratamento destas enfermidades.

Os dois hospitais de referência no Estado da Paraíba, para o tratamento dessas doenças, são: o Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da UFPB em João Pessoa, e o Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) da UFCG, em Campina Grande. No entanto, os pacientes também podem ser tratados nas unidades básicas de saúde. O laboratório Biologia de *Leishmania* sp. onde o presente trabalho se inclui ajuda no diagnóstico de pacientes com leishmaniose Visceral e Tegumentar atendido no HULW.

Embora já existam dois estudos sobre parasitos de *L. (L.) chagasi* associados a leishmaniose visceral (LV) estado da Paraíba (ROCHA et al, 2004; SEGATTO et al., 2012) até o momento, nenhum estudo foi realizado visando a caracterização de parasitos do gênero *Leishmania* associados a LTA neste estado.

Figura 7: Casos de LTA por faixa etária de acordo com a forma clínica no estado da Paraíba



Fonte: Brasil, 2010b (SINAN/SVS/MS)

1.5 Tratamento das leishmanioses

O tratamento da LT é um desafio para os médicos, porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, sérios efeitos adversos, além de não serem totalmente eficazes contra os diferentes tipos de manifestações clínicas da doença (CROFT et al., 2006; MALTEZOU et al., 2010; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011). A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento devido aos efeitos colaterais, são fatores que limitam o sucesso no uso das drogas utilizadas atualmente no tratamento dessa doença (LIMA et al., 2007; TUON et al., 2008a; GOTO; LINDOSO, 2010). Apesar disso, a droga de primeira escolha para o

tratamento de todas as formas clínicas desta doença, continuam sendo os antimoniais pentavalentes utilizados a mais de 70 anos (BALAÑA-FOUCE, 1998; RATH et al., 2003).

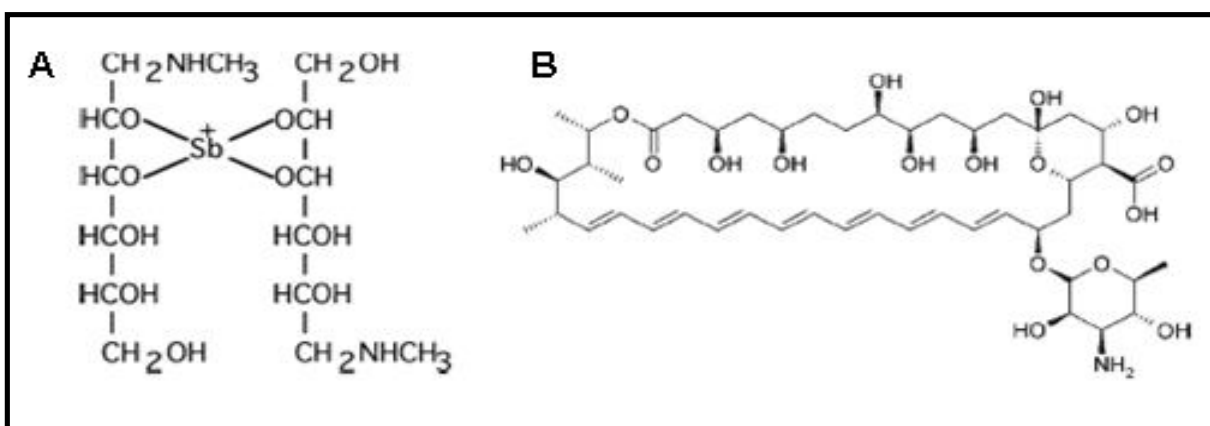
A primeira droga a ser utilizada na terapêutica das leishmanioses no homem, foi o tártaro emético, um antimonial trivalente (Sb^{III}). Contudo devido a sua alta toxicidade, foi substituída pelos antimoniais pentavalentes (Sb^{V}), que são menos tóxicas a exemplo de gluconato de antimônio (V) sódico e o antimoniato de meglumina, conhecidos comercialmente por Pentostan[®] e o Glucantime[®], respectivamente (RATH et al., 2003; CARRIÓ et al; 2000; OUELLETE et al., 2004; MALTEZOU et al., 2010; ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011).

O primeiro tratamento para as leishmanioses foi realizado em 1912 com o tartaro emético, um antimonio trivalente desenvolvido por Gaspar Vianna. Porém devido aos diversos e graves efeitos colaterais, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por compostos pentavalentes. Dentre esses compostos pentavalentes, o Glucantime[®] (antimoniato de meglumina) é o utilizado como droga de primeira escolha no Brasil (Figura 8A) para o tratamento das formas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC), disseminada (LCDS) e visceral das leishmanioses (LV) (RATH et al., 2003; BRASIL, 2010a). O ministério da saúde recomenda que o seu uso não ultrapasse os 20mg/kg de (Sb^{V}), com a dose máxima de 850 mg por paciente ao longo dos 20-30 dias de tratamento (BRASIL, 2010a). Embora ainda assim, casos de efeitos colaterais são relatados com o seu uso através de quadros de mialgias, dores abdominais, alterações das transaminases hepáticas e alterações cardiológicas, revelando-se muitas vezes necessária a internação dos pacientes (BALAÑA-FOUCE, 1998; BRASIL, 2010a; GOTO; LINDOSO, 2010; ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011). Além disso a forma de administração do Glucantime[®] é por via parenteral e requer o acompanhamento clínico desses pacientes, que por muitas vezes, não suportam o longo período de tratamento e acabam abandonando pela metade ou até ocorrem casos de óbitos (CROFT; YARDLEY, 2002; CROFT; COOMBS, 2003; ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011). Existe evidências de que o Glucantime é uma pró-droga, pois no interior de macrófagos ou mesmo no interior das formas amastigotas de *Leishmania* sp. (RATH et al., 2003; FREZARD; DEMICHELI, 2001), este antimônio pentavalente é convertido em trivalente, mais tóxico e eficaz na morte dos parasitos.

No Brasil, a droga de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses é a Anfotericina B[®] (deoxicolato) (Figura 8B), um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. O seu mecanismo de ação decorre de sua ligação ao ergosterol do parasito com consequente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico,

resultando na destruição dos parasitos (BALAÑA-FOUCE, 1998; LIMA et al., 2007). Embora atue na cura das leishmanioses, são comumente utilizadas quando não há resposta dos pacientes ao tratamento com Glucantime[®], devido a sua alta toxicidade e histórico de efeitos colaterais, assim como os elevados custos da sua produção (LIMA et al., 2007).

Figura 8: Estruturas químicas das drogas referência utilizados na terapêutica das leishmanioses.



Fonte: Croft et al., 2003. Sb^V, antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) a droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (A). Anfotericina B[®], formulação lipídica utilizada como droga de segunda preferência no Brasil (B).

As drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses não tiveram muitas alterações desde seu desenvolvimento. Dentre as falhas no tratamento está o surgimento de cepas resistentes, como é relatado em estudos experimentais (ASHUTOSH; SUNDAR et al., 2007; MALTEZOU 2010). Além disso diversos estudos têm mostrado que as diferentes espécies e cepas de *Leishmania* têm variações em relação às respostas terapêuticas onde isolados de *Leishmania* sp. têm demonstrado perfil de sensibilidade diferentes frente a essas drogas de referência (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; AREVALO et al., 2007).

Alguns estudos já identificaram diferenças na sensibilidade de formas promastigotas de isolados de *L. (V.) braziliensis* ao Antimônio pentavalente (ROMERO et al., 2001; AZEREDO-COUTINHO et al., 2007; LUZ, VERMEERSCH; DUJARDIN, 2009; ZAULI - NASCIMENTO et al., 2009). A anfotericina B é identificada como significativamente mais tóxica para as formas promastigotas de *Leishmania* do que o antimônio pentavalente. Contudo, têm sido também demonstrado variações na sensibilidade de diferentes cepas e

isolados de *Leishmania* a este antibiótico (CROFT; YARLEY 2002; RATH et al., 2003; ZAULI-NASCIMENTO et al., 2009).

Estudos vêm demonstrando que dentre as formas clínicas tegumentares os pacientes com leishmaniose mucocutânea e difusa, apresentam um maior índice de insucesso no tratamento apresentando casos frequentes de falhas e recidivas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010). Contudo, não são compreendidas as causas associadas a estas deficiências na resposta ao tratamento. Tornam-se então viáveis estudos que enfoquem o conhecimento desses parasitos estudando sua variabilidade genética pois esta pode ter como consequência a produção de diferentes fenótipos, que podem estar associados com as respostas aos tratamentos dessas enfermidades (CUPOLILO et al., 2003; GOTO; LINDOSO, 2012).

1.6 Diagnóstico das leishmanioses

Existem diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses. O método parasitológico é o mais utilizado e se constitui na técnica "ouro" de diagnóstico (FERRER, 1999; GONTIJO; MELO, 2004). Permite a visualização de formas amastigotas de *Leishmania* em preparações em lâmina de lesões e aspirado de medula óssea ou ganglionar ao microscópio óptico comum (HERWALDT, 1999; KILIC et al., 2008). Além disso o método parasitológico pode ser também realizado através do exame em cultura que permite o crescimento das formas promastigotas do parasito em meio de cultura (CUBA et al., 1986 apud ROMERO et al., 2001; SCHALLIG; OSKAM, 2002; GONTIJO; MELO, 2004). Contudo o diagnóstico parasitológico apresenta desvantagens como baixa sensibilidade e essa perda de sensibilidade ocorre principalmente em estágios iniciais da doença, quando a carga parasitária é baixa ou ainda quando a cultura é contaminada por outros microrganismos (CUBA et al., 1986 apud ROMERO et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004). O tempo de crescimento do parasito que é variável e por vezes leva algum tempo para crescerem. E essa dificuldade é maior ainda em enfermidades causada pela espécie *L. (V.) braziliensis* que são relatadas como sendo de parasitismo escasso e, portanto menos sensíveis a esse método parasitológico (CUBA et al., 1986 apud ROMERO et al., 2001). Nenhuma das técnicas de diagnóstico é completamente satisfatória; o exame direto tem baixa sensibilidade, quando

comparado com a cultura “ *in vitro* ”, no entanto se o parasita não crescer rapidamente, os resultados só serão obtidos após várias semanas (GONTIJO; MELO, 2004).

Entre os vários tipos de diagnósticos laboratoriais realizados para a detecção da leishmaniose, os métodos imunológicos estão entre os mais empregados, sendo as técnicas de ELISA e de imunofluorescência são particularmente importantes. A técnica de ELISA tem sensibilidade semelhante e menor especificidade que a técnica de imunofluorescência, porém possui um custo maior. Um dos problemas dos métodos imunológicos é a questão da reatividade cruzada, ou seja, a ligação de um anticorpo inespecífico ao antígeno, os chamados falsos positivos. A reatividade cruzada culmina em diagnóstico errôneo e tratamento desnecessário (SCHALLIG; OSKAM, 2002; GONTIJO; MELO, 2004).

Por outro lado as técnicas moleculares têm demonstrado uma maior eficácia no diagnóstico das leishmanioses, pois proporcionam meios rápidos e seguros para a realização deste diagnóstico (LACHAUD et al., 2000), podendo também proporcionar a identificação da espécie de *Leishmania* sp. A técnica de maior destaque em função de sua sensibilidade e especificidade é a PCR, que pode ser utilizada com uma variedade de alvos, dentre os quais podemos citar seqüências de DNA codificadoras de RNA ribossômico (rDNA), locus da enzima Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD - DNA de cinetoplasto (kDNA) entre outros (SCHALLIG; OSKAM, 2002; GONTIJO; MELO, 2004).

1.7 Material Genético da *Leishmania* sp.

O conhecimento sobre o genoma da *Leishmania* sp. esteve limitado durante muito tempo, devido às dificuldades na determinação da ploidia e determinação do seu número de cromossomos, já que não há condensação desses durante a mitose no ciclo celular (BASTIEN et al., 1992). Durante muitas décadas acreditou-se que esses parasitos eram constituídos de população extensivamente clonal, sem possibilidades de troca genéticas e que além disso se reproduziam exclusivamente por fusão binária (GRIMALDI et al., 1989; BANULS et al., 2002). Atualmente a diploidia em *Leishmania* sp. está aceita, com a hipótese de alguns cromossomos serem aneuploides (BANULS et al., 2007; ROUGERON et al., 2010). E alguns estudos descrevem que apesar da propensão para a clonalidade a existência de recombinação genética em *Leishmania* sp., e consequentemente são também uma realidade e que essa pode dar origem a híbridos com genótipos emergentes epidemiologicamente importantes

(TIBAYRENC et al., 2002; NOLDER et al., 2007; HAMAD et al., 2011; ROUGERON et al., 2010; RAVEL et al., 2006; ROUGERON et al., 2010). Além disso estudos têm mostrado que no velho mundo (*L. (L.) donovani* e *L. (L.) major*) as espécies de *Leishmania* possuem 36 cromossomos e no novo mundo (*L. (L.) mexicana* e *L. (V.) braziliensis*) as espécies têm 34 ou 35 (WINCKER et al., 1996). Além disso, apesar de ser um organismo eucarioto, parasitos da espécie *Leishmania* sp. apresentam características ímpares, similares aos seus ancestrais bacterianos: carência de introns, agrupamento policistrônico dos genes com uma maquinaria transcricional simplificada, no qual há processamento de mRNA por “trans-splicing” acoplado a poliadenilação (IVENS et al., 2005; SMITH et al., 2008).

Parasitos do gênero *Leishmania* sp. pertencem a ordem Kinetoplastida que possuem uma característica distinta entre os demais grupos de protozoários, o cinetoplasto, uma estrutura mitocondrial única que contém uma rede de moléculas de DNA concatenados (kDNA). Esse kDNA representa cerca de 25% do DNA total da célula e apresenta dois tipos moléculas circulares: maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos estão presentes em menor quantidade (cerca de 5%) e são formados por seqüências homogêneas. Os outros 95% correspondem aos grupos de seqüências heterogêneas que são os minicírculos (DEGRAVE, 1994). Os minicírculos do kDNA apresentam regiões conservadas e variáveis. A região conservada possui aproximadamente de 120 a 200 pb e está relacionada com a replicação dos minicírculos. A região variável é responsável pela codificação de grande parte dos RNAs guias necessários para a edição de transcritos de maxicírculos (DEGRAVE, 1994).

A técnica de sequenciamento de nucleotídeo de DNA, tem sido aplicada e explorada em busca de maiores informações sobre genomas de espécies de *Leishmania*. Em 1994, estabeleceu-se, no Rio de Janeiro- RJ, o Centro de Projetos de Sequenciamento do genoma de uma espécie de *Leishmania*, o “Leishmania Genome Network (LGN)”, que visou o Sequenciamento da cepa de referência *Leishmania major* Friedlin associada a LT no velho mundo, comumente utilizada em estudos bioquímicos, imunológicos e genéticos (IVENS; BLACKWELL, 1999).

Em 2005, o genoma deste parasito foi completamente sequenciado e toda a seqüência de DNA, assim como as proteínas pré-ditas se tornaram disponíveis ao acesso público (IVENS et al., 2005). O Projeto Genoma de *Leishmania* sp. veio acumulando informações acerca da estrutura e organização genômica destes parasitos e além de *L. major*, já estão sequenciados também os genomas das espécies *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* comumente associadas as leishmanioses visceral e tegumentar respectivamente (PEACOCK et al., 2007). Estudos comparativos realizados com estes três genomas identificaram uma

conservação em cerca de 99% dos genes nas espécies estudadas, identificando aproximadamente 200 genes com distribuição diferencial entre as espécies (PEACOCK et al., 2007). O sequenciamento do genoma de *Leishmania* ampliou as estratégias de estudo com relação aos genes de virulência, sobrevivência intracelular e resistência a drogas, bem como a validação funcional de proteínas, específicas do parasito, como novos alvos para quimioterapia e para a imunoterapia (CORTAZAR;WALKER, 2004).

1.8 Técnicas moleculares utilizadas na identificação e caracterização de *Leishmania* sp.

Atualmente, estão disponíveis métodos que além de serem bastante sensíveis para o diagnóstico são bastante versáteis para a identificação e classificação de diversidade dentre as espécies de *Leishmania*, em particular a reação em cadeia da polimerase (PCR) (SHAW et al., 2005; MAIA et al., 2007; VAEZNIA; SADRAEI; PIRSTANI, 2009; BUITRAGO et al., 2011; DOUDI; GHASEMI; SETORKI, 2012). Estes estudos têm reforçado a classificação inicial do gênero *Leishmania* sp., descrito por Laison e Shaw., (1987), além de demonstrarem diferenças e semelhanças inter e intra-específicas entre parasitos pertencentes aos dois subgêneros, ajudando na análise da classificação e variabilidade existente entre eles (CUPOLILLO et al., 2003).

A tipagem de isoenzimas tem sido considerados como o método de referência para a caracterização de espécies de *Leishmania*, onde facilmente identifica perfis heterozigóticos desses parasitos (SCHÖNIAN et al., 2003). Contudo apresenta algumas limitações, principalmente por ser muito laboriosa e com necessidade de grandes volumes de culturas “*in vitro*” de parasitas (SCALLING; OSKAM, 2002).

A técnica de PCR tem sido amplamente empregada em estudos de classificação dentro do gênero *Leishmania* sp. Técnicas como PCR específica, RFLP-PCR, RAPD-PCR, SSR-PCR, que são as mais utilizadas para o estudo de identificação e caracterização de diferentes regiões gênicas (SHAW et al., 2005). Esses estudos envolvem regiões gênicas amplificadas com iniciadores específicos, com conhecimento prévio da sequência a ser estudada, regiões repetitivas do genoma com reconhecimento de sítios múltiplos além de regiões desconhecidas no genoma por iniciadores aleatórios (SCHALLING; OSKAM, 2002; SHAW et al., 2005). Nesse contexto os marcadores genéticos mais utilizados na identificação e caracterização de *Leishmania* são sequências como: espaço interno transcrito do DNA ribossômico (ITS-

“internal transcribed spacer”) (VAN EYS et al., 1992; SCHÖNIAN et al., 2003; BUITRAGO et al., 2011; DOUDI; GHASEMI; SETORKI, 2012), mini-exon (VAEZNIA; SADRAEI; PIRSTANI, 2009), sequências conservadas do kDNA, (CHICHARRO et al., 2002; CORTES et al., 2004; DEGRAVE et al., 1994), genes que codificam para diferentes proteínas conservadas como a *hsp70* (GARCIA et al., 2007; SILVA et al., 2010) e microsatélites (BULLE et al., 2002; OCHSENREITHER et al., 2006; KHULS et al., 2007).

A PCR específica para *Leishmania* surgiu dentro do contexto do uso da PCR para detecção e identificação de espécies de diferentes organismos. Os primeiros estudos foram realizados Rogers e colaboradores, (1990) com o DNA purificado, porém a maioria dos trabalhos objetivam a utilização do kDNA por ser um excelente alvo molecular. Desde então vários pesquisadores vêm desenvolvendo iniciadores para uso na PCR que detectem e identifiquem os isolados de *Leishmania* em nível de subgênero ou complexo. Com o uso de kDNA sequenciado de espécies de *Leishmania* sp., os pesquisadores De Bruijn; Barker, 1992, criaram os iniciadores específicos para espécies do complexo *L.(V.) braziliensis* (B1/B2) cuja reação é negativa para as outras espécies do complexo *L. (L.) mexicana*. Estudos complementares realizados por Eresh e colaboradores, (1994) desenvolveram iniciadores específicos que reconhecem espécies do complexo *L. (L.) mexicana* (M1/M2) e não as do complexo *L. (V.) braziliensis* possibilitando a diferenciação de espécies dentro desses dois complexos. Desde então vários estudos têm utilizado esses iniciadores para diferenciarem isolados de diferentes formas clínicas em todas as regiões do país (RODRIGUES et al., 2002; ISHKAWA et al., 2003; CUPOLLILO et al., 2003; LANUS et al., 2005; MARTINS et al., 2010).

São numerosas as técnicas utilizadas atualmente para a análise de polimorfismos inter e intraespecíficas entre esses parasitos, dentre eles esta o RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) que estuda o polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente sem necessidade prévia de conhecimento da sequência alvo. Os iniciadores utilizados são curtos e de baixa estringência (GOMES et al., 1995; GONTIJO et al., 2000; MARTINEZ et al. 2003). Com esta técnica já foi possível demonstrar variabilidade entre amostras de isolados de diferentes espécies *Leishmania* que pertenciam tanto a regiões distintas como entre a mesma região (GOMES et al., 1995; CASTRO et al., 2005; SEGATTO et al., 2012). Estudos realizados por Ishikawa e colaboradores, com isolados de diferentes regiões diferenciou isolados do Subgênero *Viannia* e *Leishmania* e foi capaz de demonstrar diferença polimórfica entre os isolados de *L.(V.) braziliensis* que se agruparam em clusters diferentes de acordo com a origem geográfica. Da mesma forma numerosos outros autores também já demonstraram que

isolados provenientes de diferentes formas clínicas de LTA apresentavam variabilidade diferenciadas entre si, dependendo da região geográfica, demonstrando alto grau de entre a espécie de *L. (V.) braziliensis* (GOMES et al., 1995; SCHRIEFER et al., 2004, CASTRO et al., 2004).

Os microssatélites são unidades curtas, com poucos nucleótidos e repetidas em tandem no genoma de eucariontes a exemplo do parasita *Leishmania*. O método da PCR associada a essas repetições de sequências simples (SSR-PCR- Simple Sequence Repeats) vem sendo amplamente utilizadas no estudo da variabilidade genética. A classe mais abundante nesses organismos são os (CA)_n e em menor proporção os (CT)_n ou K7 (STALLINGS et al., 1991) e ambas são sequências que possuem um grande nível de polimorfismo em relação ao número de unidades repetitivas se constituindo numa excelente ferramenta de estudos genéticos (JAMJOOM et al., 2002; KHULS et al., 2005; 2007). Khuls e colaboradores (2005, 2007) já demonstraram que esses marcadores são validos para estudos de variabilidade genética, ao mostrarem variabilidade entre isolados de *L. (L.) infantum/chagasi*, e as maiores variedade foram encontradas entre os isolados de regiões diferentes. Além disso, outro estudo já demonstrou que isolados de *L.(V.) amazonensis* de uma região da Bahia são geneticamente diversas, em que não foram encontradas correlação com o polimorfismo e a forma clínica dos pacientes (OLIVEIRA et al., 2007). Estudos similares foram realizados por Rougeron e colaboradores, (2008), que estudaram diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* com esse marcador molecular e verificaram heterozigozidade entre os mesmos, validando essa técnica molecular na análise genética de populações.

A técnica de PCR-RFLP consiste em amplificar sequências alvo de nucleotídeos e posteriormente clivá-las com enzimas de restrição. O estudo de proteínas de choque térmico tem sido bastante utilizado na caracterização de *Leishmania* sp. São proteínas importantes na localização intracelular, secreção, regulação estabilização e degradação de outras proteínas a exemplo da proteína de choque térmico *hsp70*, altamente conservada entre os eucariontes tanto em sequência como na funcionalidade. No parasito *Leishmania* sp., essas proteínas estão relacionados com eventos que ocorrem durante a transformação de promastigotas em amastigotas como o aumento de temperatura e diminuição de pH (GARCIA et al., 2004; FRAGA et al., 2010).

Acredita-se que há um único gene *hsp70* no genoma desses parasitos especificamente no da *L. (V.) braziliensis* a espécie utilizada no estudo por Zurita e colaboradores, 2003. Estudos com essa região gênica foram realizados por Fraga e colaboradores, 2010, onde a partir da técnica de RFLP-PCR foi possível distinguir não apenas as espécies de *Leishmania*

dos demais parasitos, como de espécies do subgênero *Viannia* das do subgênero *Leishmania*. De forma semelhante já se evidenciou que a região conservada hsp70 através da técnica de RFLP-PCR com diferentes enzimas de restrição não se limita a ser a um ótimo marcador para identificação de espécie mas também para análises de polimorfismo entre diferentes isolados. Foi o que Silva et al., (2010) fizeram ao identificarem diferentes espécies como *L. braziliensis* em isolados de diferentes regiões do Brasil, além de demonstrarem polimorfismo entre as mesmas.

O estudo do polimorfismo existente numa região do minicírculo de kDNA através da técnica PCR-RFLP tem sido utilizado na identificação de espécies do gênero *Leishmania*. Estudos realizados por Volpini e colaboradores, (2004), aplicando esta técnica em uma região do minicírculo do kDNA identificaram 66 isolados humanos com LT como pertencentes a as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Esta abordagem foi também utilizada para identificação de isolados de cães com leishmaniose visceral (ANDRADE et al., 2006; QUARESMA et al., 2009)

A análise na sequência ITS (ITS1 e ITS2) através da técnica de PCR-RFLP, tem sido empregada no estudo do polimorfismo intraespecífico. O ITS₁ e o ITS₂ se localizam entre os genes 18S e 28S do rDNA (SSU e LSU respectivamente), e são regiões que embora apresentem uma significativa conservação, são mais variáveis, do que os genes do rDNA, e podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no seu comprimento (CUPOLILLO et al., 1995).

Diversos estudos têm sido preconizados utilizando a região ITS₁ pela técnica de PCR-RFLP. Buitrago e colaboradores (2011) estudando isolados obtidos de pacientes da Bolívia verificaram que isolados de *L. (V.) braziliensis* apresentaram um polimorfismo maior do que os isolados de *L. (L.) amazonensis*. Yang e colaboradores, (2010), também observaram diferenças entre isolados de uma região da China, estudando a região variável ITS₁ das mesmas. Estes estudos permitem conhecer possíveis polimorfismos entre as espécies e cepas de *Leishmania*. Em outras pesquisas já mostraram uma grande heterogeneidade entre os isolados de *L. (L.) major*, com cerca de 5 subtipos genotípicos. De forma semelhante Oliveira e colaboradores, (2007), evidenciaram um significativo polimorfismo genético em 18 isolados de *L. (L.) amazonensis*.

Cupolillo e colaboradores (1995) verificaram um significativo polimorfismo entre diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* analisando esta região gênica. A mesma autora e seus colaboradores em 2003 fizeram estudos semelhantes com isolados de diferentes regiões do Brasil, onde ficou demonstrado que existe polimorfismo entre os mesmos. Contudo o

polimorfismo observado foi diferente dependendo da origem de cada isolado. De forma geral os isolados da região Amazônica foram os que se revelaram mais heterogêneos, possivelmente devido à existência de diferentes vetores e reservatórios para os diferentes parasitos que ali coabitam. Por outro lado os isolados das regiões de mata atlântica foram mais homogêneos entre si. Esses estudos foram realizados com a enzima de restrição BstUI e HhaI. Resultados similares haviam sido encontrados pela mesma autora, Cupolillo et al., 1998, em estudo da região ITS₁/ RFLP-PCR em associação com a técnica de izoenzimas, também demonstrou uma elevada variabilidade entre os isolados identificados como sendo *L. (V.) braziliensis*.

1.9 Justificativa

No Brasil, a LTA constitui-se em uma das maiores afecções dermatológicas públicas do país, sendo já registradas em todas as 27 federações brasileiras (BRASIL, 2010). A LTA Compreende um amplo espectro de manifestação clínica caracterizada por infecções confinadas a derme sob quatro formas básicas, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), LCD, LCDS e a LMC (SILVEIRA et al., 2008b; BRASIL, 2010). No Brasil já foram identificados sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas como agentes etiológicos de LT, porém a *L. (V.) braziliensis* é o agente etiológico mais freqüente, associadas às manifestações clínicas de LCL, LMC e LCDS. Esses dados são confirmados em diversos estudos realizados com isolados de diferentes regiões geográficas do Norte ao Sul do país (ISHIKAWA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; CUPOLILO et al., 2003; BRANDÃO-FILHO, 2003; SILVEIRA et al. 2008b; MARTINS et al., 2010).

Os fatores relacionados às diferentes manifestações clínicas da LTA não estão inteiramente elucidados, mas provavelmente as variações genéticas de ambos, hospedeiro e parasito são importantes neste contexto (CUPOLILLO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2008). Assim, a pesquisa de polimorfismos genéticos intraespecíficos de *L. (V.) braziliensis* pode potencialmente levar a um melhor entendimento da epidemiologia molecular da doença.

Apesar de já existirem alguns estudos genéticos utilizando amostras de *L. (V.) braziliensis* em diversos estados brasileiros (GOMES et al., 1995; CUPOLILLO et al., 2003; SCHRIFER et al., 2004), nenhum deles foi realizado no estado da Paraíba. O conhecimento biológico, imunológico, genético e eco-epidemiológico podem contribuir para o aumento no

no controle e medidas futuras para o tratamento dessas enfermidades (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; SHAW, 2007). Com isso o nosso grupo é o primeiro a realizar estudos que visam identificar e caracterizar os parasitos *Leishmania* sp. envolvidos nas diferentes manifestações clínicas da LTA no estado da Paraíba e dessa forma suprir essa falta de informação sobre os parasitos *Leishmania* sp. associados a estas enfermidades nesta região.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Isolar e realizar a caracterização molecular e fenotípica de parasitos *Leishmania sp.* obtidos de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) de pacientes atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba.

2.2 Objetivos específicos:

Realizar o diagnóstico parasitológico em pacientes atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley da UFPB com clínica sugestiva de LTA;

Realizar o isolamento de parasitos *Leishmania* de casos clínicos de humanos com LTA de pacientes atendidos no hospital Lauro Wanderley da UFPB;

Identificar, em nível de espécie as amostras clínicas de pacientes acometidos com LTA através das técnicas de PCR específica;

Avaliar polimorfismos do DNA genômico utilizando diferentes marcadores genéticos;

Caracterizar o perfil de crescimento dos isolados de *Leishmania* em meio de cultura;

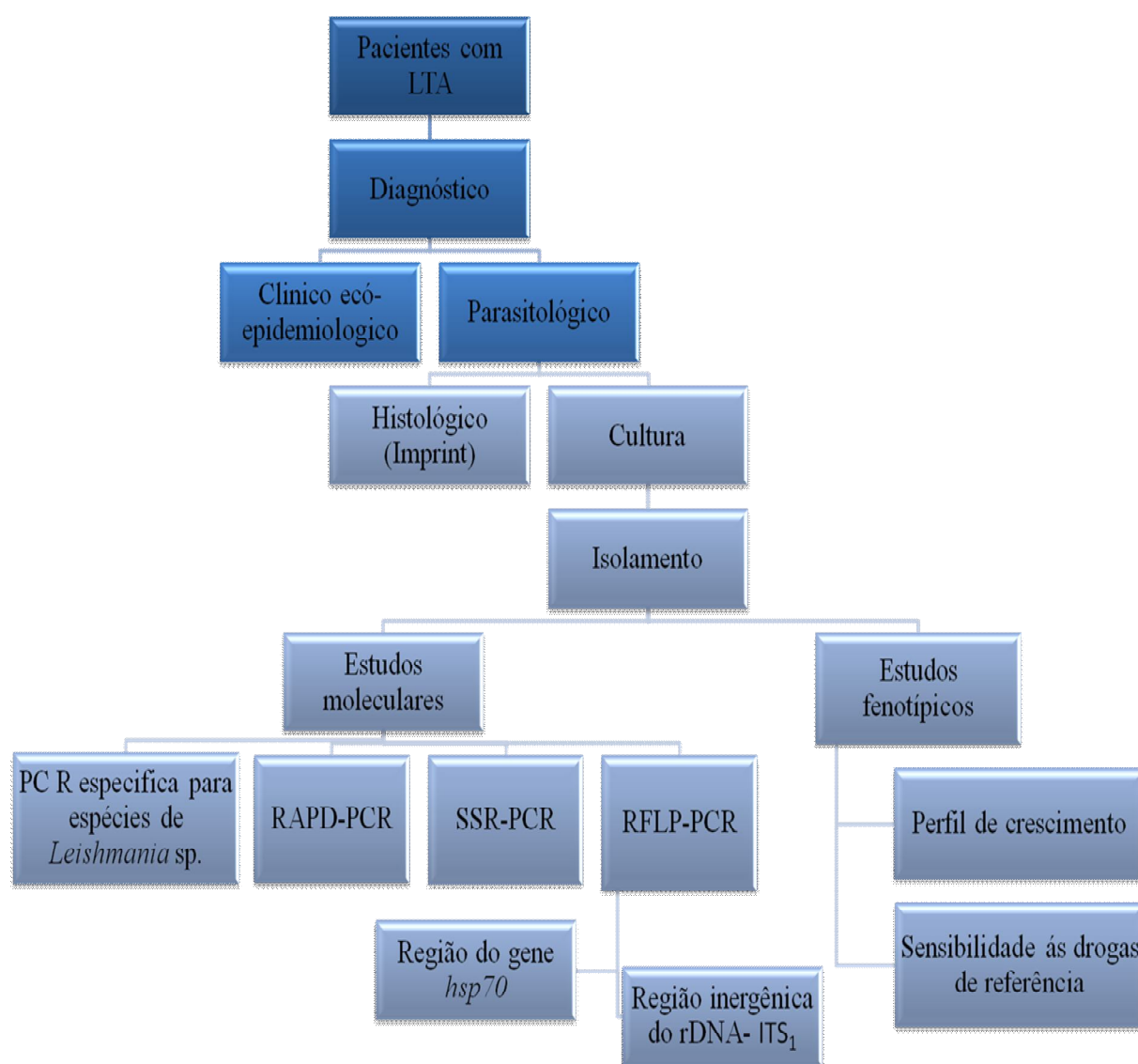
Estudar a sensibilidade dos isolados às drogas de referência antimônio pentavalente, antimônio trivalente e Anfotericina B.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

Na figura 9 está representada um esquema geral de todo o procedimento experimental utilizados no presente estudo.

Figura 9: Esquema geral de todo o procedimento experimental utilizados no presente estudo.



Fonte: Rodrigues, Y. K.S., 2012

3.1 Origem dos pacientes suspeitos de LTA

Os pacientes envolvidos no estudo foram atendidos no setor de doenças infecto-contagiosas /DIC do Hospital Universitário Lauro Wanderley da UFPB, na capital João do estado da Paraíba entre 2009 e 2011. O projeto foi realizado dentro das normas da Universidade tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisas em seres humanos – CEP do HULW/UFPB sob o N° **0244.0.126.000-11** (Anexo I).

3.2 Análise clínica dos pacientes e diagnóstico parasitológico

A análise clínica foi realizada com o auxílio de profissionais do HULW da UFPB, sob a supervisão do Dr. Benedito Bruno de Oliveira. Foi realizada uma descrição da (s) lesão (ões) dos pacientes, registrando o número de lesões, presença ou não de ulcerações, acometimento ou não de mucosas. Dados de caráter clínico e epidemiológico foram obtidos através da aplicação de um questionário a todos os pacientes com suspeita de leishmaniose cujas biópsias foram obtidas (Anexo II).

Para a realização do diagnóstico parasitológico foram obtidas biópsias das lesões dos pacientes suspeitos de leishmaniose tegumentar. A coleta das biópsias foi realizada em local adequado por médicos do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB sob a supervisão do Dr. Benedito Bruno de Oliveira. A área acometida com a lesão foi devidamente assepsiada com álcool e analgesiada com Lidocaina® e com auxílio de pinças e “punches”, um pequeno fragmento da lesão (0.2-0-5mm) foi retirado. Em seguida foram realizados esfregaços dos fragmentos das biópsias em lâminas, coradas com panótico rápido e visualizadas sob microscopia óptica comum num aumento de 100x com auxílio de óleo de imersão para a busca de formas amastigotas de *Leishmania* sp. Paralelamente, fragmentos das biópsias foram inoculados em meio de cultura Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal e antibióticos penicilina a 100ul/mL e estreptomicina a 100ul/mL, incubados a 25 C por 5 a 10 dias e analisados sob microscopia óptica para a pesquisa de formas promastigotas dos parasitos. Nos casos de diagnóstico parasitológico positivo, estes resultados foram repassados ao Dr. Benedito Bruno de Oliveira do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB que providência o tratamento dos pacientes.

3.3 Isolamento dos parasitos

Biópsias de lesões suspeitas de leishmaniose tegumentar foram obtidas como descrita no item anterior. Esses pequenos fragmentos foram inoculados em meio de cultura Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal e antibióticos penicilina a 100ul/mL e estreptomicina a 100ul/mL em tubos apropriados e transferidos para o Laboratório Biologia de *Leishmania* do Departamento de Biologia Molecular da Universidade da Paraíba DBM /CCEN/ UFPB e incubados em estufa a 25 °C. Nos dias subsequentes, essas culturas foram avaliadas sob microscopia óptica para a pesquisa do parasito. Paralelamente, as culturas foram repicadas em tubos com meio Schneider completo e em seguida foram criopreservadas e posteriormente reativadas para os diversos estudos de caracterização e molecular e biológica.

3.4 Cepas de referência de *Leishmania* sp.

A título de comparação, foram utilizadas oito diferentes espécies de *Leishmania* sp., sendo sete cepas de referência da OMS e uma refere-se uma cepa caracterizada pelo grupo como *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Quadro 1).

Quadro 1: Cepas de Referência da OMS, utilizadas no presente estudo.

Espécies	Código internacional	Classificação
<i>L. (V.) brasiliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903	LC
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1970/ M1176	LC
<i>L. (V.) naifi</i>	MHOM/BR/ 1980/ M5956	LC
<i>L. (V.) lansonii</i>	MHOM/BR/ 1981/ M6426	LC
<i>L. (V.) shawi</i>	MHOM/BR/ 1971/ M8408	LC
<i>L. (L.) amazonensis</i>	INFLA/BR/1968/PH8	LC
<i>L. (L.) major</i>	MHOM/IL/1980/FN	LC
<i>L. (L.) chagasi</i> *	MCAN/BR/1999/JP15	LV

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. * A cepa JP15 incluída nessa tabela é uma cepa caracterizada pelo grupo como *Leishmania chagasi*.

3.5 Parasitos e sua manutenção

Os isolados de *Leishmania* sp. obtidos de pacientes com quadro clínicos de Leishmaniose Tegumentar, assim como as cepas de referência utilizadas foram cultivadas a 25°C em meio bifásico ágar-sangue “Novy-MacNeal-Nicolle” (NNN) associado ao meio líquido Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal e antibióticos penicilina a 100ul/mL e estreptomicina a 100ul/mL (Schneider completo). As culturas foram criopresservadas em nitrogênio líquido após adição de 10% de glicerol (ROCHA et al., 2004).

3.6 Extração de DNA de *Leishmania* sp.

Para a obtenção do DNA dos parasitos foi aplicada a metodologia de extração por clorofórmio/fenol (modificado de SAMBROOK et al., 1989). Os parasitos em manutenção ou retirados da criopresservação foram cultivados em meio Schneider completo, centrifugados a 9000 RPM por 10 minutos e ressuspensos em 300µL/10⁸ parasitos em solução de lise (SDS 1% NaCL 80 mM + EDTA 45 mM). Para cada tubo foram adicionados (10µL) de proteoquinase K (20mg/mL) e incubados em banho-maria a 37°C “overnight”. No dia posterior foi adicionado nas amostras, um volume de 300µL fenol, homogeneizado por 5 minutos e centrifugados 5 minutos a 1500g. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionado um volume de 300 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneizar por 5 minutos, estes foram centrifugados 5 minutos a 1500g (realizou-se este último procedimento duas vezes). Após centrifugação coletou-se a fase aquosa e adicionou-se 2,5 mL de etanol gelado e 30µL de acetato de sódio NaAC (3M). Em seguida os tubos foram colocados no freezer a -20°C por no mínimo 1 hora e centrifugados novamente a 12000 RPM durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi secado. O DNA foi então ressuspensado em 50µL de água Mili-Q autoclavada, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% e quantificadas em Nanodrop (ng/µL). O DNA extraído foi mantido a -20°C até a sua utilização para os estudos moleculares.

Os produtos de extração foram analisados em gel de agarose como descrito no item 3.12.

3.7 Identificação de *Leishmania* sp através de PCR específica

As amostras de DNA obtidas foram utilizadas para a amplificação dos minicírculos de kDNA destas amostras, em termociclador, MJ Research Inc, modelo PTC-100, utilizando dois pares de iniciadores B1/B2, que amplificam produtos de 750pb (BRUIJN; BARKER, 1992) específicos para espécies do complexo *L. (V.) braziliensis* e M1/M2, específicas para o complexo *L. (L.) mexicana*, que amplificam produtos de 730pb (ERESH et al., 1994). O programa de amplificação utilizado foi aquele descrito por Cortes e colaboradores, (2004), Os iniciadores foram produzidos pela XXIDTI- integrated DNA technologies. Para controles positivos e negativos foram utilizadas as cepas de referência MHOM/BR/1975/M2903 - *L. (V.) braziliensis* e IFLA/BR/1968/PH8 - *L. (L.) amazonensis*. Esses iniciadores específicos foram desenhados a partir do sequenciamento das regiões conservadas dos minicírculos de kDNA de várias espécies de *Leishmania*. As sequências dos mesmos estão descritas abaixo (Quadro 2) juntamente com os reagentes (Quadro 3) e o ciclo de amplificação (Quadro 4) utilizados na reação de PCR.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.13.

Quadro 2: Iniciadores específicos utilizados para a identificação de *Leishmania* sp. nas amplificações pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Iniciador	Sequência	Nº de nucleótidos	Referências
B1	5'- GGGGTTGGTGTAATATAGTGG -3'	21	BRUIJN; BARKER, 1992
B2	5'- CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'	19	
M1	5'- CCAGTTTCGAGGCCCCGGAG-3'	19	ERESH et al., 1994
M2	5'- GGTGTAAAATAGGGGCGGATGCTCTG-3'	26	

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 3: Reagentes utilizados nas amplificações específicas para a identificação de *Leishmania* sp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Reagentes	Concentração	Volume
H₂O (nuclease free)	_____	5 µL
TAMPÃO	10 x	1,0 µL
DNTPs	0,2 Mm	0,8 µL
Iniciadores (B1/B2-M1/M2)	10 Pmol (cada)	1,0 µL 1,0 µL
Taq DNA polimerase	2,5 U	0,2 µL
DNA	1ng/µl	1,0 µL
Volume Final	_____	10 µL

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 4: Ciclo de amplificação utilizada para a PCR específica para a identificação de *Leishmania* sp. com os iniciadores B1/B2 e M1/M2.

Ciclo de amplificação		
	B1/B2	M1/M2
Desnaturação	96°C _____ 6'	96°C _____ 6'
Anelamento	67,5°C _____ 1'	67,5°C _____ 1'
Extensão	72°C _____ 1'	72°C _____ 1'
Desnaturação	93°C _____ 30'	93°C _____ 5'
	26 ciclos	35ciclos

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

3.8 Amplificação aleatória de DNAs polimorficos (RAPD-PCR):

Para este estudo foram utilizados 4 iniciadores (Quadro 5), que têm sido amplamente utilizados para estudos de várias espécies do subgênero *Viannia*. Os reagentes utilizados para essa reação estão descritos no quadro 6 e o ciclo de amplificação utilizado foi modificado de Gomes et al., (1995) está representado no quadro 7.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.13.

Quadro 5: Iniciadores randômicos utilizados na reação de RAPD-PCR para todas as amostras de *Leishmania* sp.

Iniciadores	Sequência	Nº nucleotídeos	Referências
L15 (996)	5'CTCCACCATAGCACCCAAAGC 3'	22	DIRENZO et al., 1991.
M13F-40	5'GTTTTCCCAGTCACGAC 3'	17	HU;MESSING,1982.
P53	5'ACGACAGGGCTGGTTGCCCA3'	20	NIGRO et al., 1989.
P14	5'-AGG CGA TAA-3	9	NIGRO et al., 1989.

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 6: Reagentes utilizados na reação de RAPD-PCR para todas as amostras de *Leishmania* sp.

Reagentes	Concentração	Volume
H2O (nuclease free)	_____	2,99 µL
Tampão	10x	1 µL
Mix green 2x	2x	5 µL
Iniciadores: L15(996), M13-40F, P53, P14, BO7	6,4 Pmol	1 µL
Mgcl₂	25mM	0,1 µL
DNA	1ng/µl	1,0 µL
Volume Final	_____	10 µL

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 7: Ciclos de amplificação utilizada nas reações de RAPD-PCR.

Ciclo de amplificação	
Desnaturação	95°C → 5'
Anelamento	30°C → 2'
Extensão	72°C → 1'
Desnaturação	95°C → 30''
2 Ciclos	
Anelamento	40°C → 2'
Extensão	72°C → 1'
Desnaturação	95°C → 30''
33 Ciclos	
Extensão final	72°C → 5'

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

3.9 Reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR)

A amplificação do DNA utilizando repetições de sequências simples foi realizada com um iniciador o CAA (CT)₆ conhecido como iniciador K7 (WU et al., 1994). Esse iniciador é ancorado na extremidade 5' e amplifica tanto a região inter-repetições quanto as próprias repetições (Figura 10).

Figura 10: Esquema representativo da região amplificada pelo iniciador CAA (CT)₆ conhecido como K7.

Fonte: Modificado de Gontijo, C. M. F., 2001.

Nos quadros 8, 9 e 10, encontram-se a descrição do iniciador, reagentes e ciclos de amplificação utilizados respectivamente nessas reação de SSR-PCR. As reações de amplificação foram realizadas segundo Zietkiewicz e colaboradores, (1994) com modificações introduzidas por Oliveira e colaboradores, (1997).

Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.13.

Quadro 8: Iniciador utilizado na amplificação pela reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR).

Iniciador	Sequência	Nº de nucleotídeos
K7	CCA (CT)₆	15

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 9: Reagentes utilizados na amplificação pela reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR).

Reagentes	Concentração	Volume
H2O (nuclease free)	_____	2,99 µL
Tampão	10x	1 µL
Mix green 2x	2x	5 µL
Iniciador: K7	6,4 Pmol	1 µL
Mgcl₂	25mM	0,1 µL
DNA	1ng/µl	1,0 µL
Volume Final	_____	10 µL

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 10: Ciclo de amplificação utilizado na reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequência simples (SSR-PCR).

Ciclo de amplificação – iniciador K7 [CCA (CT)]	
Desnaturação	94°C → 3'
Anelamento	42°C → 45''
Extensão	72°C → 1'
Desnaturação	94°C → 30''
Anelamento	42°C → 45''
26 ciclos	
Extensão final	72°C → 7'

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

3.10 PCR-RFLP da região ITS 1 rDNA

Foi amplificada a região de ITS₁ do DNAr (Figura 11) das diferentes amostras de DNA estudadas. Da mesma forma que em vários trabalhos com isolados de diferentes regiões geográficas (CUPOLILLO et al., 2003; GARCIA et al., 2005) A região ITS₁ do DNAr das amostras em estudo foi amplificada com os iniciadores LITSR e L5.8S descritos no quadro 11, que amplificam produtos de 300-350 pb. Os reagentes utilizados e o ciclo para a amplificação do DNA das amostras em estudo estão descritos nos quadros 12 e 13, respectivamente.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose como descrito no item 3.12.

Figura 11: Organização do locus do rDNA dos tripanossomatídeos. Subunidades conservadas SSU (subunidade menor) e LSU (subunidade maior) subunidade variável: ITS₁ e ITS₂.



Fonte: Modificado de LIMA, A. C. V. M. R., 2010.

Quadro 11: Iniciadores utilizados nas amplificações da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS₁.

Iniciadores	Sequência	Número de nucleotídeos
LITSR	5'-CTGGATCATTTTCCGATG3'	18
L5.8S	5'TGATACCACTTATCGCACTT3'	20

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 12: Reagentes utilizados nas amplificações da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS₁.

Reagentes	Concentração	Volume
H2O (nuclease Free)	-----	5, 85µL
Tampão	10X	1,0 µL
Dntps	12,5mM	0,8 µL
Iniciadores: LITSR	10 pmol	0,5 µL
L5.8S	10 pmol	0,5 µL
Taq Polimerase	5U	0,2 µL
DMSO	-----	0,75 µL
MgCl₂	50mM	0,75 µL
DNA	1ng/ µL	1,0 µL
Volume Final	-----	10 µL

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 13: Ciclo de amplificação da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS₁.

Ciclo de amplificação ITS1	
Desnaturação	92°C → 2'
Desnaturação	95°C → 20''
Extensão final	72°C → 6'
Anelamento	53°C → 30''
Extensão	72°C → 1'
32ciclos	

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

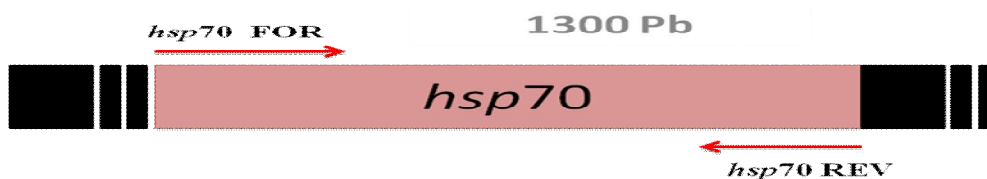
Para a clivagem do DNA com a enzima de restrição HaeIII, foram utilizados 5 µl do produto amplificado da região espaçadora intergênica transcrita do rDNA, ITS₁; 5 µL de mix (contendo: 1,5 µL de tampão 10x (15mM), 1,0 µL da enzima HaeIII 10/ µL e 7,5 µL de H₂O livre de DNA/RNA. A solução foi incubada em banho-maria por 3h a 37°C. Os produtos digeridos foram analisados em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.13.

3.11 PCR-RFLP da região do gene *hsp70*

Para as reações de PCR da região do gene *hsp70* (Figura 12), foram utilizados os iniciadores *hsp70* FOR e o *hsp70* REV (GARCIA et al., 2004) (Quadro 14). Nos quadros 15 e 16 estão descritos os reagentes utilizados e o ciclo de amplificação para a região *hsp70*, respectivamente.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.13.

Figura 12: Organização da região do gene *hsp70* do DNA amplificada com os iniciadores *hsp70* REV e *hsp70* FOR



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 14: Iniciadores utilizados para a reação de cadeia de polimerase para a região *hsp7*.

Iniciadores	Sequência	Número de nucleotídeos
<i>hsp70</i> FOR	5'GACGGTGCCTGCCTACTTCA3'	21
<i>hsp70</i> REV	5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC3'	21

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 15: Reagentes utilizados no preparo do mix para reação de cadeia de polimerase para a região *hsp70*.

Reagentes	Concentração	Volume
H2O (nuclease free)	_____	5, 85 µL
Tampão	10 x	1,0 µL
dNTPs	10mM	0,8 µL
Iniciadores: <i>hsp70</i> For	10 pmol	0,5 µL
<i>hsp70</i> Rev	10 pmol	0,5 µL
Taq polimerase	5U/µL	0,2 µL
DMSO	_____	0,75 µL
MgCl ₂	50mM	0,75 µL
DNA	1ng/ µL	1,0 µL
Volume Final	_____	10 µL

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Quadro 16: O ciclo de amplificação para a região *hsp70*

Ciclo de amplificação	
Desnaturação	94°C → 5'
Anelamento	61°C → 1'
Extensão	72°C → 3'
Desnaturação	94°C → 30''
Extensão final	72°C → 10'
35 ciclos	

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Foram utilizados 5 µL do produto amplificado (das amostras utilizada), 5 µL de mix (contendo: 1,5 µL de tampão 10x (15mM), 1,0 µL da enzima BstUI 10/ µL e 2,5 µL de H₂O livre de DNA/RNA) a solução foi incubada em banho-maria por 2h a 60°C.

Os produtos digeridos foram analisados em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.13.

3.12 Análise em gel de agarose

Os géis foram preparados utilizando agarose 1,2 % (Ultra puro GIBCO BRL) TBE 1x e 5µL da solução de brometo de etídio a 10mg/ml. Nas canetas foram adicionados 5µL das amostras e 5 µL do tampão de corrida Blue Orange 6x (PROMEGA). A eletroforese foi realizada a temperatura ambiente por cerca de 40 minutos numa corrente de 80 volts (Na Mini - PROTEAN® 3 System - BIO RAD-USA). Os marcadores de peso molecular utilizados foram 100pb da Promega e 1kb Plus da Invitrogen que estão descritos nas legendas dos respectivos géis. Os géis foram visualizados em transluminador (Vilber Lourmat) sob luz ultravioleta e fotografados (ALVARENGA, A. C., 2010).

3.13 Análise em gel de poliacrilamida

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%. Os reagentes utilizados para o preparo do gel estão listados no quadro 17. Foram aplicados 2 µL de cada amostra (material amplificado); 3 µL do tampão de amostra (Blue/orange Loading Dye, 6x, Promega) em cada canaleta do gel, que foi submetido à eletroforese a por 80 volts aproximadamente 45 minutos a análise do produto de amplificação de PCR específica. Para a análise do produto de amplificação por RAPD e o SSR-PCR foram aplicados 3 µL das amostras diretamente no gel e submetido à 80 volts eletroforese por aproximadamente quatro horas (na cuba PROTEAN® 3 System - BIO RAD-USA- GIBCO-BRL-USA). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, com o gel submerso em tampão de eletroforese (TBE 1X). Os marcadores de peso molecular utilizados foram 50pb e 100pb da Promega e 1kb Plus da Invitrogen, dependendo do material a ser analisado. Após a corrida eletroforetica os géis foram visualizados por coloração em nitrato de prata (protocolo modificado de Santos et al., 1993). A revelação, montagem e secagem do gel de poliacrilamida foram baseadas no seguinte protocolo: ao terminar a corrida eletroforetica os géis foram colocados na solução fixadora (100mL de etanol; 5mL de ácido acético; VF: 1000mL) por 3-5 minutos, Solução de prata (0,3 g de nitrato de prata por 7-10 minutos; 50 mL da solução fixadora (100 ml de dd H₂O); VF: 150 mL, lavados com dd H₂O 2x e colocados na solução reveladora (30g de NaOH; 3mL de formaldeído; VF: 1000mL) até a visualização das bandas: Os geis foram novamente lavados duas vezes com dd H₂O e submersos em solução fixadora. Estes foram então fotografados e secos para armazenamento dos dados.

Quadro 17: Componentes do gel de poliacrilamida.

Componentes do gel de poliacrilamida
Solução poliacrilamida (Acrylamide/bis-acrylamide- SIGMA) 40% solução estoque 29:1;
Persulfato de amônio a 10% (amonion persulfate 98%- NH ₄ /2S ₂ O ₂ Fw 228,2 - SIGMA)
TEMED (tetramethylethylenediamine/ 99%-t291-25 ml- SIGMA)

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

3.14 Análise dos resultados de RAPD/PCR, SSR-PCR e PCR-RFLP e construção dos fenogramas.

Para estudar o padrão de bandas obtido em cada amostra foram analisadas fotografias visualmente e os padrões de bandas inseridos manualmente no computador. O programa DNA-POP (PENA; NUNES, 1990) foi usado para calcular a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras. Este programa usa como princípio básico, a divisão vertical do gel em níveis de mobilidade. Um nível é definido pela presença de, pelo menos, uma banda em qualquer uma das canaletas do gel. A área analisada em cada gel foi definida de acordo com a definição de bandas. O *Software* Treecon (VAN DER PEER, 1994) foi utilizado para a construção dos fenogramas. Estes foram construídos pelo Método da Média Aritmética não Ponderada - UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) (SNEATH; SOKAL, 1973). A partir de cada uma destas matrizes, automaticamente é construída uma árvore fenética. As árvores obtidas são, então, comparadas entre si. A significância estatística de um determinado agrupamento é dada pela porcentagem de árvores, baseadas nos dados reamostrados, contendo aquele agrupamento (FELSENSTEIN, 1985). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bootstrap com 1000 reamostragens, para verificação da consistência dos resultados. Os valores de *Bootstrap* acima de 70% foram considerados significativos (HILLIS; HUELSENBECK, 1992).

3.15 Análise do crescimento dos isolados de *Leishmania* sp. em meio de cultura

Curvas de crescimento dos isolados foram realizadas, com o objetivo de analisar o comportamento dos parasitos em meio de cultura. Os isolados de *Leishmania* spp. foram estudados quanto a riqueza e mobilidade dos parasitos através de análise microscopia óptica. Foi realizado, em duplicata, um inóculo de 7×10^5 células/mL de meio de cultura em garrafas contendo 35 mL de meio Schenneider completo. Para esse inóculo foram utilizadas culturas com três dias de cultivo. As culturas foram mantidas em estufa incubadora a 25° C e examinadas qualitativa e quantitativamente ao microscópio óptico diariamente. Para a contagem das células, aliquotas das culturas foram diluídas em solução Isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCL, 15 mL de formol e 1 L de água destilada) e o crescimento dos parasitos quantificado com o auxílio da câmara de Neubauer (OLIVEIRA et al., 1999). O

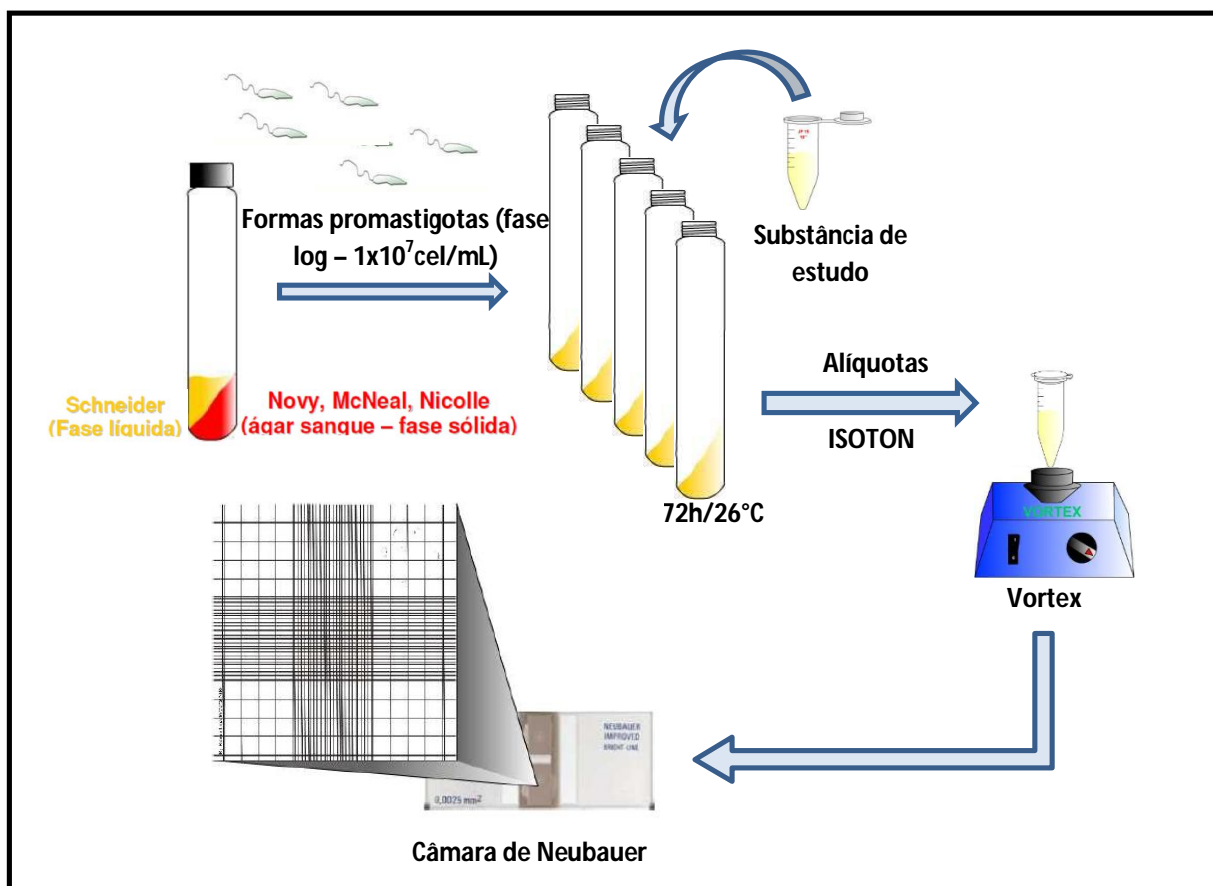
número obtido em cada dia foi utilizado para construir as curvas de crescimento, as quais forneceram os perfis de desenvolvimento de cada cepa no meio Schneider completo. Foram calculados os desvios padrões para cada média obtida em cada tempo e construído gráficos utilizando o *software* Microsoft Excel.

3.16 Sensibilidade das formas promastigotas dos isolados de *Leishmania* sp. ao antimônio pentavalente (Glucantime), antimônio trivalente e a Anfotericina B

O antimônio pentavalente (Glucantime®, Aventis Pharma, Brasil) foi cedido pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. O mesmo foi diluído em água destilada ou em meio de cultura (Schneider completo) nas experimentações realizadas. A Anfotericina B® também foi concedida pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley, com as seguintes características: solução de 50mg/mL, pó liofilo injetável IV, Cristolia, COD 21.1184.v/08., MS nº 1.0298.0229. A Anfotericina B® foi diluída em água destilada ou em meio Schneider completo de acordo com as necessidades experimentais. O antimônio trivalente (POTASSIUM ANTIMONYL, TARTRATE TRIHYDRATE 99%, A.C.S REAGENT $C_8H_4K_2O_{12}Sb_3 \cdot 3H_2O$ FW 667.9) foi cedido gentilmente pelo pesquisador Rubens Lima de Monte Neto da Universidade Federal de Belo Horizonte.

Formas promastigotas dos diferentes isolados de *Leishmania* sp., foram analisadas quanto a sensibilidade das drogas de referência. Esses experimentos foram realizados em tubos de ensaio contendo meio Schneider completos e parasitos em fase logarítmica de crescimento (1×10^6 células/mL) (Figura 13). As drogas foram inoculadas em diferentes concentrações e após 72 horas de incubação à 25°C, alíquotas foram retiradas das culturas, diluídas em solução de Isoton, homogenizadas no vortez e quantificadas através de contagem direta das células sob microscopia óptica em câmara de Neubauer.

As culturas mantidas na ausência dos compostos foram denominadas controles, onde seu crescimento foi considerado 100% e os cálculos da porcentagem de inibição dos compostos foram realizados em relação a esta cultura controle

Figura 13: Avaliação da atividade antipromastigotas de espécies de *Leishmania* sp.

Fonte: Neris, P. L. Formas promastigotas em fase logaritmica de crescimento (1×10^7 cel/mL) foram incubadas na presença dos Antimônios pentavalente (Sb^V), trivalente (Sb^{III}) ou Anfotericina B em diferentes concentrações. Após 72h de incubação a 26°C, alíquotas foram diluídas em solução de ISOTON e quantificadas em câmara de Neubauer, através de microscopia óptica comum.

3.17 Análise Estatística

Os dados obtidos em cada experimento foram comparados utilizando o teste “T – Student” para dados paramétricos, e Mann-Whitney, para dados não paramétricos. Para o cálculo de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos) foi utilizado o modelo probit de análise de regressão. Para realização da análise estatística e geração de gráficos, foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significativos.

O *Software* Treecon (VAN DER PEER, 1994) foi utilizado para a construção dos fenogramas. Estes foram construídos pelo Método da Média Aritmética não Ponderada - UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) como detalhado no item 3.14.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Características dos pacientes diagnosticados com LTA e isolados de *Leishmania* sp. obtidos desses pacientes

Os isolados de *Leishmania* sp., foram obtidos de pacientes com quadro clínico de leishmaniose tegumentar, atendidos no Hospital universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB). Entre as biópsias coletadas e analisadas em cultura/lâmina e confirmadas como casos de LT, foram obtidos treze isolados de *Leishmania* sp. Destes, nove isolados foram estudados no presente trabalho.

No quadro 18 estão listados e descritas algumas características dos pacientes dos quais foram obtidos os isolados de *Leishmania* sp.

Quadro 18 – Características dos pacientes com leishmaniose tegumentar dos quais foram obtidos isolados de *Leishmania* sp. (M: masculino, F: feminino).

Pacientes	Sexo	Idade	Origem	Isolados
JCTS	M	25	Pilões/Pinturas	MHOM/BR/2010/JCTS
MFTS	F	15	Pilões/ - Redenção	MHOM/BR/2009/MFTS
JMTS	M	30	Pilões/Avazeado	MHOM/BR/2011/JMTS
JSL	M	32	Pilões/ Engenho Boa Fé	MHOM/BR/2010/JSL
JCNS	M	33	João Pessoa/Geisel	MHOM/BR/2010/JCNS
AF	M	46	Pilões/ Sítio Labirinto	MHOM/BR/2011/AF
JRL	M	28	Pilões/ Engenho Pinturas de Cima	MHOM/BR/2011/JRL
MRSS	F	32	Pilões/-sítio pasta	MHOM/BR/2011/MRSS
JAS	M	47	Pilões/Centro	MHOM/BR/2011/ JAS

As biópsias foram realizadas em pacientes de ambos os sexos com idade média de 32 anos, variando entre 15 a 47. Houve predominância do sexo masculino com sete isolados no total, representando 77,7% dos casos.

Entre os nove isolados estudados, oito foram correspondentes a pacientes residentes no município de Pilões, localizado na Mesorregião do Agreste e microrregião do Brejo Paraibano (Figura 14) (estado da Paraíba/BR) representando 87% do total dos pacientes estudados. Apenas um paciente possuía residência em João Pessoa na capital do estado, bairro do Geisel (13%). Dentre todos os isolados obtidos, apenas um, o JAS, foi oriundo de um caso de recidiva.

Figura 14: Município de Pilões, no estado da Paraíba.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Paraiba_Municip_Piloes.svg; Castellano, L. R. C., 2010. Mapa do estado da Paraíba com destaque em vermelho para o Município de Pilões (A). Algumas regiões visitadas no município de Pilões (A, B, C e D), onde residem 87,7% dos pacientes dos quais os parasitos foram isolados e estudados. Localizado na Mesorregião do Agreste Paraibano, possui vegetação abundante, várias plantações de bananeiras, mangueiras e coqueiros.

4.2 Forma clínica de LTA nos pacientes envolvidos no estudo

Os pacientes cujas biópsias foram positivas para *Leishmania* sp., apresentaram lesões tegumentares que variaram desde formas mais simples até as mais raras como a leishmaniose cutânea disseminada (Quadro 19). Dos nove isolados seis foram obtidos da forma clínica cutânea localizada (LCL), dois isolados da forma cutânea disseminada (LCD) e um isolado da forma mucocutânea (LMC). Dentre os isolados oriundos de leishmaniose cutânea localizada, o número de lesões na pele variou de uma a cinco lesões, dependendo do paciente.

Quadro 19: Forma clínica e características das lesões dos pacientes com leishmaniose envolvidos no estudo.
ccddc

Pacientes	Característica da lesão	Classificação
JCTS	Lesão única localizada no Membro inferior esquerdo; ulcerada; prurido; relato de dor no local.	LCL
MFTS	Três lesões: duas no antebraço e uma na mão direita; Lesões do antebraço com bordas elevadas, fundo avermelhado e granulomatoso. Lesão da mão de forma anelar e coloração escura.	LCL
JMTS	Cinco lesões ulceradas de fundo avermelhado e granulomatoso com bordas elevadas: três no abdômen e duas Membro superior direito com cerca de 3cm de diâmetro cada. Processo inflamatório nas lesões do abdômen.	LCL
JSL	Lesões em diversas regiões do corpo: duas lesões com bordas elevadas e fundo avermelhado e granulomatoso nos membros inferiores, sendo uma em cada membro, e lesões nodulares pequenas na face, membros superiores, direito e esquerdo, e costas.	LCDS
JCNS	Acometimento da cavidade nasal com perda parcial do septo e comprometimento inicial do palato; Parte interna da cavidade nasal com coloração avermelhada intensa e de aspeto granuloso; prurido. Relata ausência de dor.	LMC
AF	Cerca de 49 lesões distribuídas entre cabeça, membro superior e membro inferior. Lesões ulceradas de tamanhos variados, com bordas elevadas e crostas na superfície com processo inflamatório; prurido. Relata ausência de dor.	LCDS
JRL	Lesão única, ulcerada, avermelhada e de fundo granulomatoso localizada no Membro superior direito.	LCL
MRSS	Duas lesões rasas e eritematosas ulceradas, avermelhadas, com bordas elevadas e de fundo granulomatoso no membro inferior direito; secreção sanguinolenta; edema. Relata ausência de dor.	LCL
JAS	Duas lesões localizadas no abdômen com aspecto semi-globuloso, com bordas elevadas e ausência de edema; a lesão da pele (TE) circular com bordas elevadas e ulceradas e com fundo avermelhado e granulomatoso. Relata ausência de dor.	LCL

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

Nas figuras 15, 16 e 17 estão exemplificadas algumas das lesões dos pacientes de onde foram obtidos alguns dos isolados de *Leishmania* sp.

Figura 15: Lesão mucocutânea do paciente JCNS durante a realização da biópsia na região nasal.



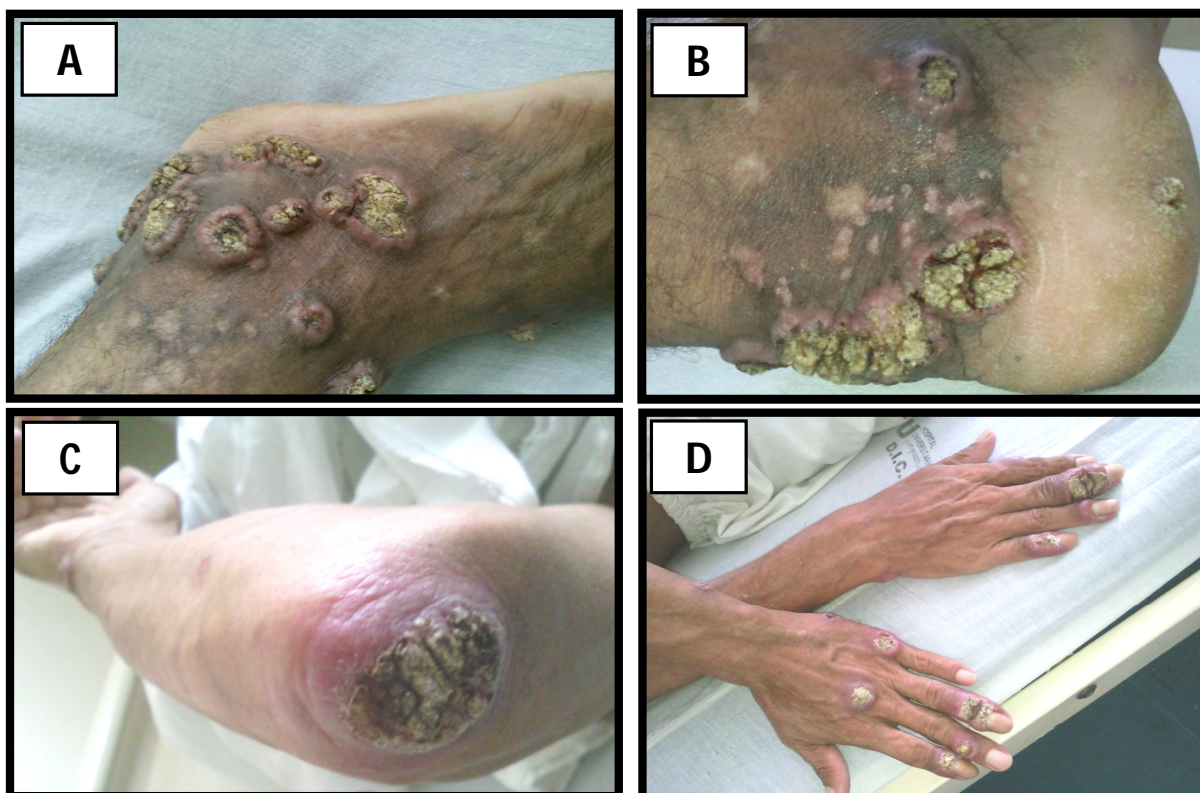
Fonte: Castellano, L. R. C., 2010. As figuras **A** e **B** mostram a lesão na região da cavidade nasal que apresenta coloração avermelhada intensa e que se encontra num estágio de perda parcial do septo nasal.

Figura 16: Lesões cutâneas localizadas do paciente MRSS, durante a realização da biópsia.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2011. A figura representa as duas lesões cutâneas com aspecto avermelhado, com bordas elevadas e de fundo granulomatoso.

Figura 17: Lesões cutâneas disseminada do paciente AF.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2011; Nérís, P. L. N., 2011. A figura representa algumas das várias lesões que o paciente apresentou, distribuídas entre a cabeça, membro superior e inferior. Lesões ulceradas de tamanhos variados, com bordas elevadas e crostas nos membros inferiores (A e B); Lesões ulceradas de tamanhos variados, com bordas elevadas nos membros superiores (C, D).

4.3 Resposta dos pacientes ao tratamento empregado

O acompanhamento clínico dos pacientes estudados foi realizado, com algumas limitações, a partir do dia da internação até a saída do HULW/UFPB, bem como em casos de recidiva da doença e em situações de visita ao município de Pilões (região com 87% do total de pacientes incluídos no estudo). Por ser um município distante, muitas vezes o término do tratamento não foi realizado no HULW, e sim no posto de saúde do município de origem.

Não foi possível realizar um acompanhamento detalhado da resposta dos pacientes ao tratamento realizado, devido a uma ausência de detalhes nos prontuários destes pacientes. Contudo, foi possível avaliar se houve ou não uma evolução para a cura clínica mediante a droga de escolha utilizada no tratamento (Quadro 20). Foi constatado que nenhum dos pacientes desistiu do tratamento. Entre os nove pacientes, oito realizaram tratamento com

Glucantime[®], com doses de 10 mg/Kg a 20 mg/Kg, sendo que nenhum deles excedeu o número de doses máximas recomendado pelo Ministério da Saúde que é de 3 ampolas por dias.

Apenas um dos pacientes, o JAS, oriundo de LCL, apresentou intolerância ao Glucantime[®] e também a Anfotericina B[®], sendo o tratamento suspenso e iniciado com uma nova medicação, o antifúngico Fuconazol, em associação com Alopurinol, obtendo assim após o término do tratamento, uma melhora clínica. Contudo, o paciente JAS apresentou recidiva das lesões após sete meses, quando então foi novamente submetido ao tratamento com Fuconazol, em associação com Alopurinol. Contudo este paciente abandonou o tratamento nos primeiros dias, logo após o início da aplicação das drogas.

Um outro paciente, o JSL, com quadro clínico de LCDS, aproximadamente um ano após o primeiro tratamento com glucantime, também apresentou um quadro de recidiva, com o surgimento de novas lesões. Esta constatação foi feita em sua residência, quando em viagem ao município de Pilões/PB. Até este período de observação, o paciente JSL não havia procurado o serviço de saúde municipal para iniciar um novo tratamento.

Quadro 20: Tratamento e resposta dos pacientes com diferentes formas clínicas de LT.

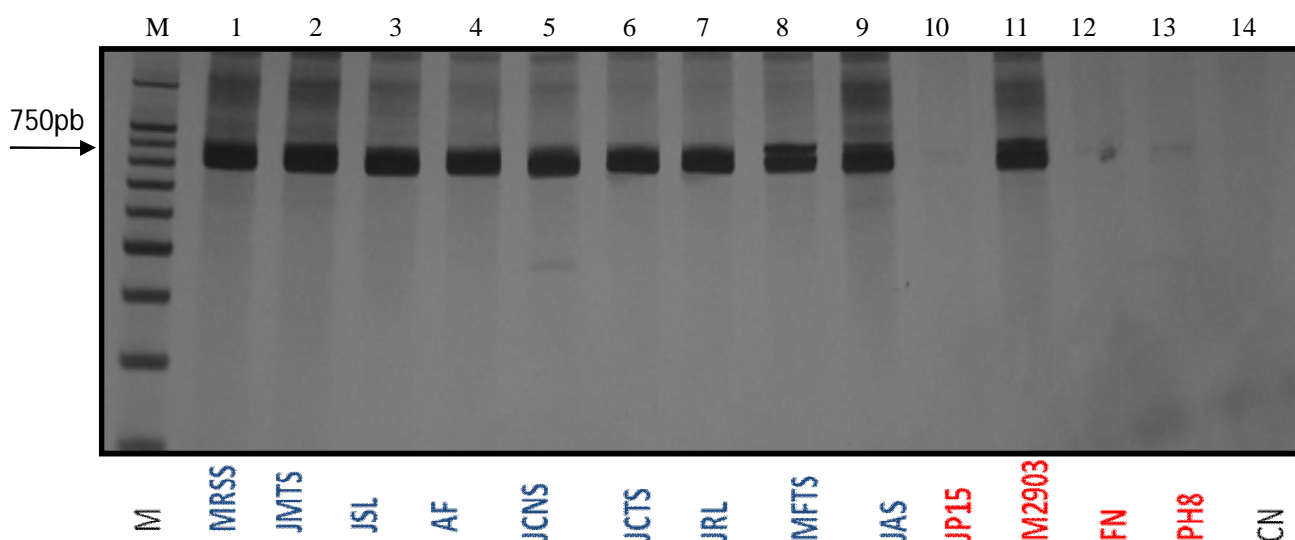
Pacientes-forma clínica	Tratamento	Resposta ao tratamento
JCTS (LCL)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
MFTS (LCL)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
JMTS (LCL)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
JSL (LCDS)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica após o primeiro tratamento com glucantime. Surgimento de novas lesões aproximadamente um ano após o final deste tratamento.
JCNS (LMC)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
AF (LCDS)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
JRL (LCL)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
MRSS (LCL)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia	Evolução para cura clínica
JAS (LCL)	Glucantime® 10mg/Kg/dia a 20mg/Kg/dia Anfotericina Fluconozol 150mg (4cp 1x/dia) e Alopurinol 10 mg (4cp 1x/dia)	Intolerância ao Glucantime® e a Anfotericina. Resposta positiva ao tratamento com Fluconozol 150mg (4cp 1x/dia) e Alopurinol 10 mg (4cp 1x/dia). Reativação das lesões após sete meses.

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012.

4.4 Identificação dos isolados de *Leishmania* sp por PCR específica

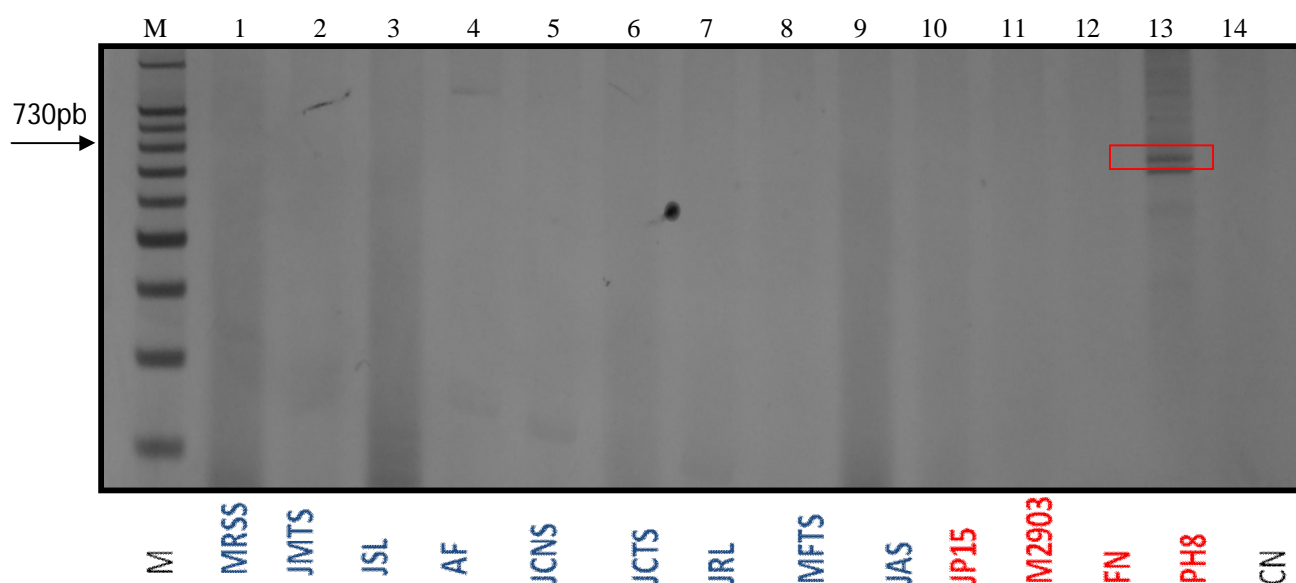
Todas as amostras estudadas foram submetidas á PCR específica para o complexo *L. braziliensis* e *L. mexicana*, da região variável dos minicírculos do kDNA. A amplificação foi realizada com os pares de iniciadores para as espécies do complexo *L. (V.) braziliensis* (B1/B2) (BRUIJN; BARKER, 1992) e do complexo *L. (L.) mexicana* (M1/M2) (ERESH et al., 1994). Todos os isolados amplificaram um fragmento de 750 pb referente ao complexo *L. (V.) braziliensis* (Figura 18), assim como a cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* (M2903). No gel com os iniciadores para o complexo *L. (L.) mexicana* (M1/M2), somente a cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* (PH8), amplificou um fragmento de 730 pb (Figura 19).

Figura 18: Gel de poliacrilamida á 5% mostrando a amplificação das amostras estudadas com os iniciadores B1/B2 específicos para espécies do complexo *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); Isolados 1-9; Cepas de referência 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12-FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- CN: controle negativo (sem DNA).

Figura 19: Gel de poliacrilamida á 5% mostrando a amplificação das amostras estudadas com os iniciadores M1/M2 específicos para espécies do complexo *L. (L.) amazonensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); Isolados 1-9; Cepas de referência: 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12- FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- CN = controle negativo (sem DNA).

4.5 Caracterização genética dos isolados do complexo *Leishmania (V.) braziliensis*

Para avaliar um possível polimorfismo genético entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* em estudo, foi realizada uma amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPDs) com diferentes iniciadores; uma reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequências simples (SSR-PCR) e uma análise dos fragmentos por enzimas de restrição (RLFP) das regiões intergênicas ITS₁ do rDNA digeridos por HaeIII e da região *hsp70* digeridos pelo BstUI.

4.5.1 Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR)

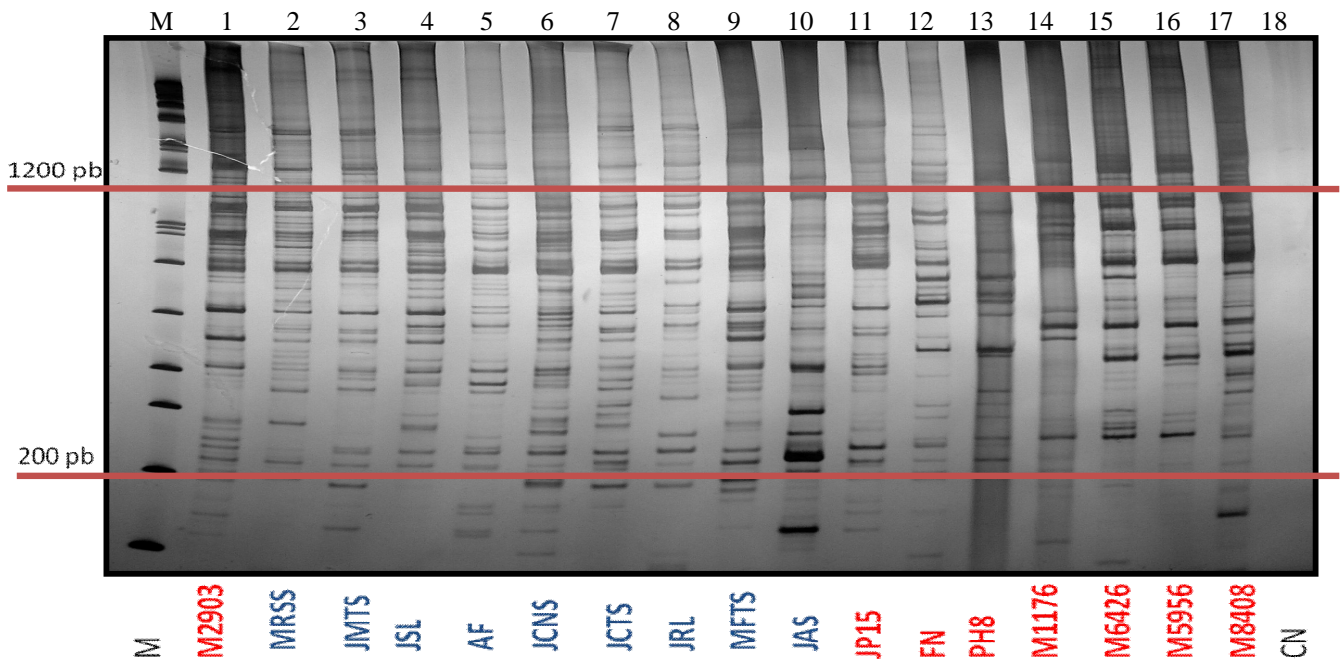
A figura 19 representa os padrões de bandas gerados pela amplificação de DNA oriundo dos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizando o iniciador P14 (HU;

MESSING, 1982). As amplificações de todas as amostras foram analisados em gel de poliacrilamida 5% e corados pela prata. A área analisada no gel contém fragmentos de DNA que variaram de 200pb a 1200pb. Diferentes padrões de bandas podem ser visualizados entre os isolados e, entre estes, e as cepas de referência utilizadas.

A figura 20 representa o fenograma de distância genética entre as amostras que foram desenhadas utilizando o “Software” Treecon pelo método UPGMA (VAN DER PEER, 1994), através da análise comparativa entre todas as amostras, considerando a presença ou ausência de bandas. Nestes fenogramas além dos agrupamentos obtidos, observa-se a escala de distância genética entre as amostras e os valores de *Bootstrap*, que indicam o percentual de confiabilidade calculado pelo teste de repetições aleatórias de amostragens. Os valores de *Bootstrap* considerados mais significativos foram os que se apresentaram superiores a 70%.

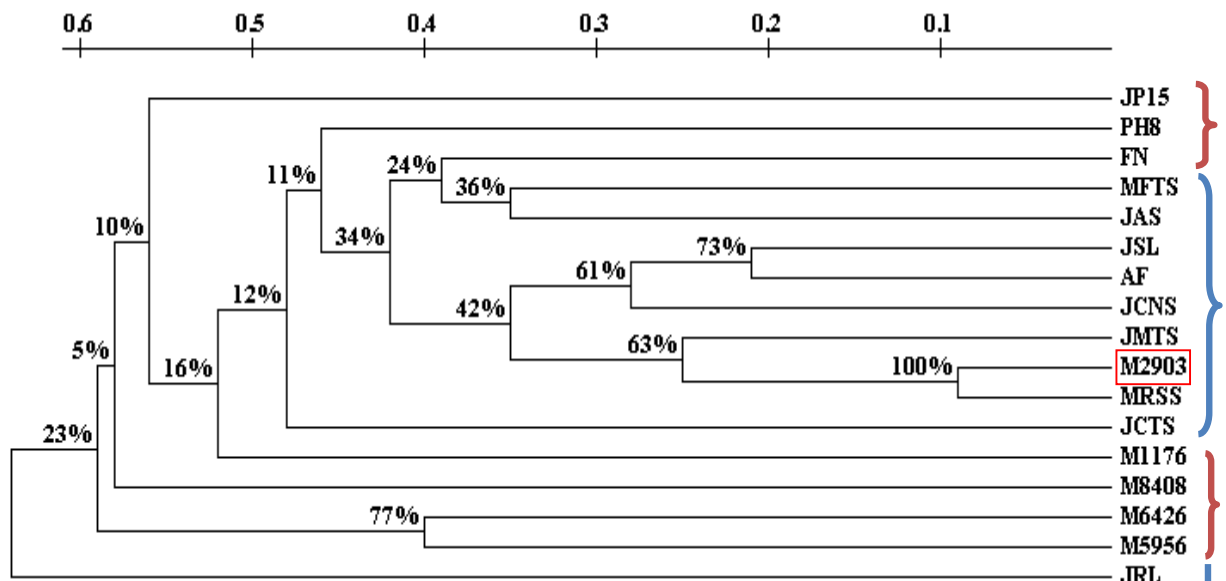
Na análise dos perfis de bandas gerados, observou-se que, com exceção do JRL, obtido de uma forma cutânea localizada, os demais isolados em estudo formaram um grande grupo juntamente com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). No fenograma construído com este iniciador o JRL posicionou-se distante dos outros isolados e da cepa M2903, ficando mais próximo das outras espécies do subgênero *Viannia*. Além disso observou-se também que os isolados que se mostraram com distância genética mais próximas foram o AF e JSL, ambas provenientes de pacientes com forma disseminada das leishmanioses. Essa proximidade foi dada por um suporte de *Bootstrap* de 73%. As outras cepas de referência PH8 (*L. (L.) amazonensis*) e FN (*L. (L.) major*) se mantiveram separadas, assim como a cepa JP15 (*L. (L.) chagasi*).

Figura 20: Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador P14 em gel de poliacrilamida á 5%.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN- controle negativo (sem DNA).

Figura 21: Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador P14.

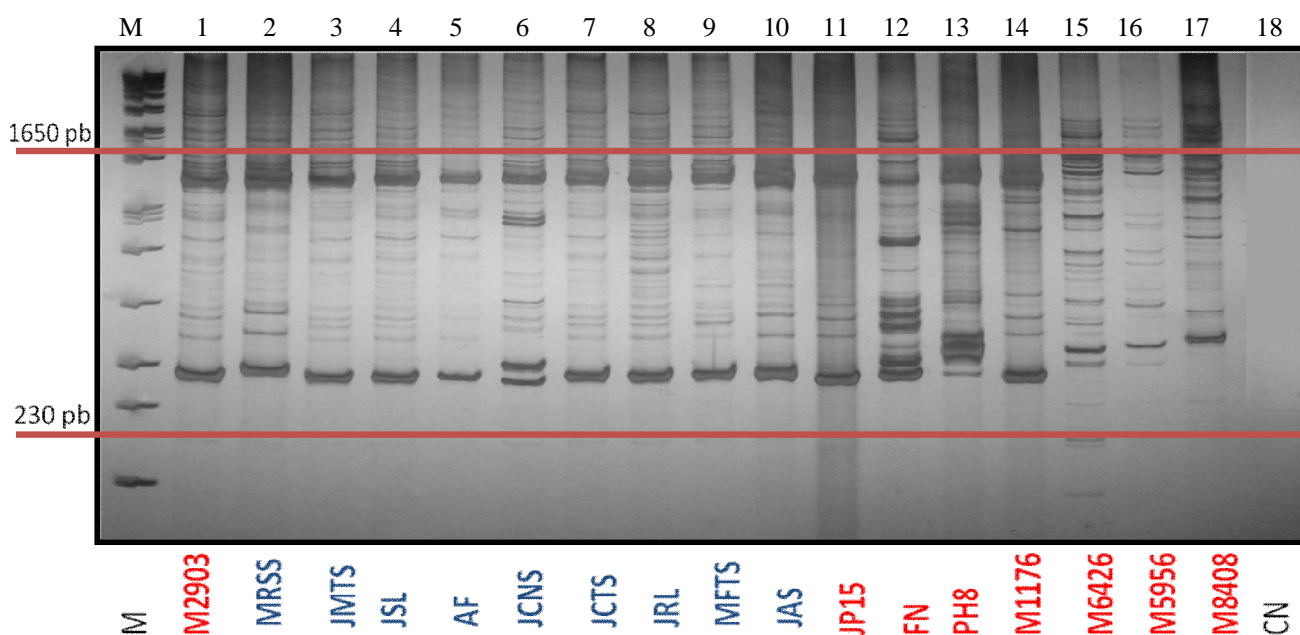


Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

Na figura 22 estão representados os padrões de bandas gerados pela amplificação de DNA proveniente dos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizando o iniciador MF13F-40 (HU; MESSING, 1982). A área analisada no gel gerou fragmentos que variaram de 230pb a 1650pb. Foram observados perfis diferentes entre as amostras utilizadas e as cepas de referência.

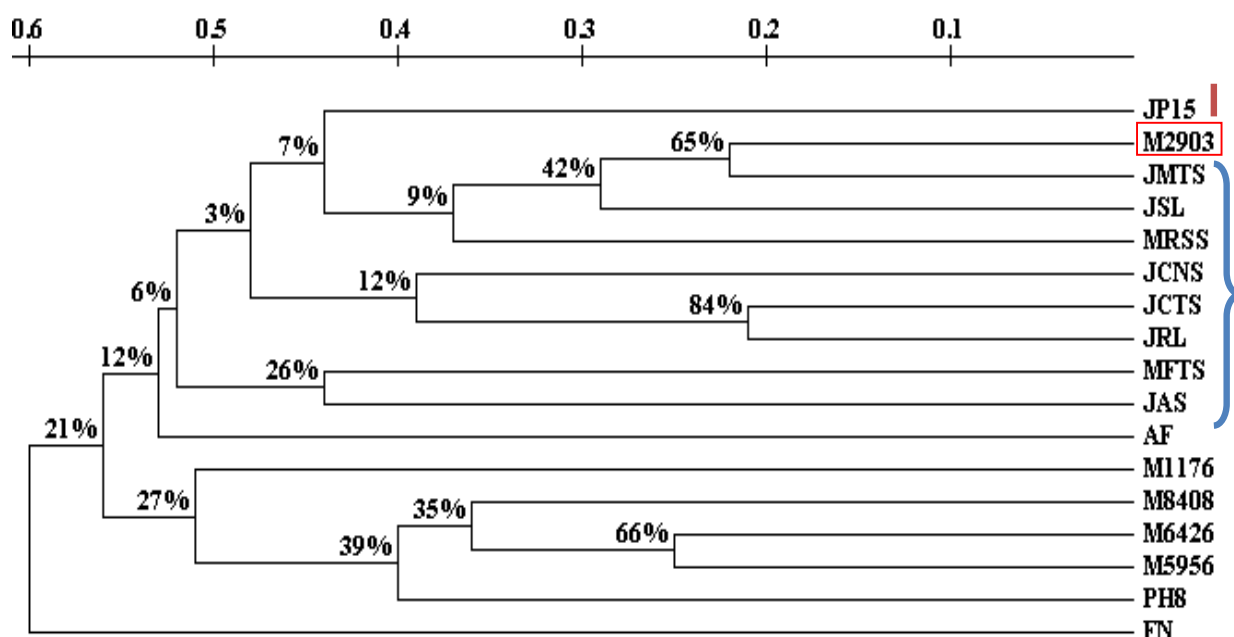
A figura 23 representa o fenograma de distância genética entre as amostras desenhados utilizando o “Software” Treecon. A comparação entre todas as amostras considerando a presença ou ausência de bandas analisadas pelo método UPGMA possibilitou a observação do agrupamento dos isolados num grande cluster juntamente com a cepa de referência M2903 (*L. braziliensis*). Contudo, embora o isolado AF tenha se mantido nesse grupo, teve uma distância maior dos outros isolados e da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Os isolados JCTS e JRL foram os que se mantiveram mais próximos nos agrupamentos com um suporte de de Bootstrap de 84%. As outras cepas do subgênero *Viannia* se agruparam juntas num único cluster e as cepas de referência PH8 (*L. (L.) amazonensis*) e FN (*L. (L.) major*) se mantiveram separadas, assim como a cepa JP15 (*L. (L.) chagasi*).

Figura 22: Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador M13F-40 em gel de poliacrilamida á 5%.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN- controle negativo (sem DNA).

Figura 23: Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador M13F-40.



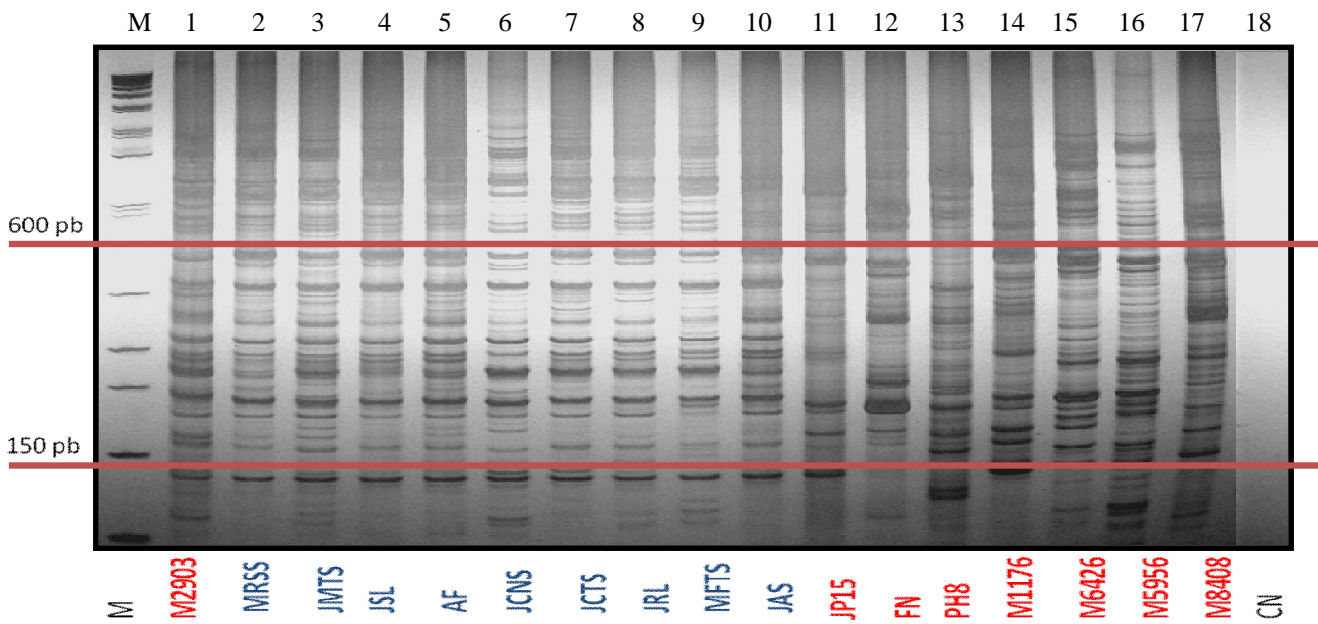
Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

Os padrões de bandas gerados pela amplificação do DNA dos diferentes isolados de *L. braziliensis* com o iniciador L15(996) (DIRENZO et al., 1991), estão representados na figura 24. A área analisada no gel variou de 150pb a 600pb.

Foram observados perfis diferentes para os diferentes isolados e cepas de referência utilizadas, sendo que um dos perfis mais diferenciados foi o do isolado JCNS.

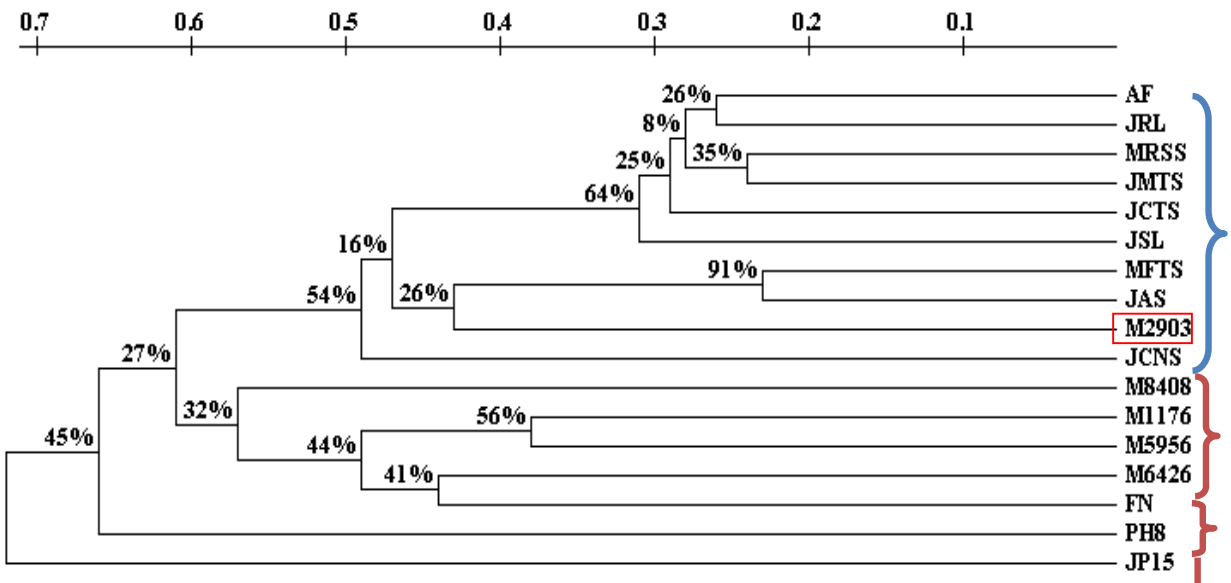
A figura 25 representa o fenograma de distância genética entre as amostras desenhados utilizando o “Software” Treecon. A comparação entre todas as amostras considerando a presença ou ausência de bandas analisadas pelo método UPGA demonstrou que, de modo geral, os isolados formaram um grande grupo juntamente com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Contudo o isolado JCNS, apresentou uma distância relativamente similar a das outras cepas do subgênero *Viannia*, embora não abrangida no mesmo cluster que esses. As outras cepas do subgênero *Viannia* se agruparam num único cluster e as cepas de referência PH8 (*L. (L.) amazonensis*) e FN (*L. (L.) major*) se mantiveram separadas assim como a cepa JP15 (*L. (L.) chagasi*).

Figura 24: Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador L15(996) em gel de poliacrilamida á 5%.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN- controle negativo (sem DNA).

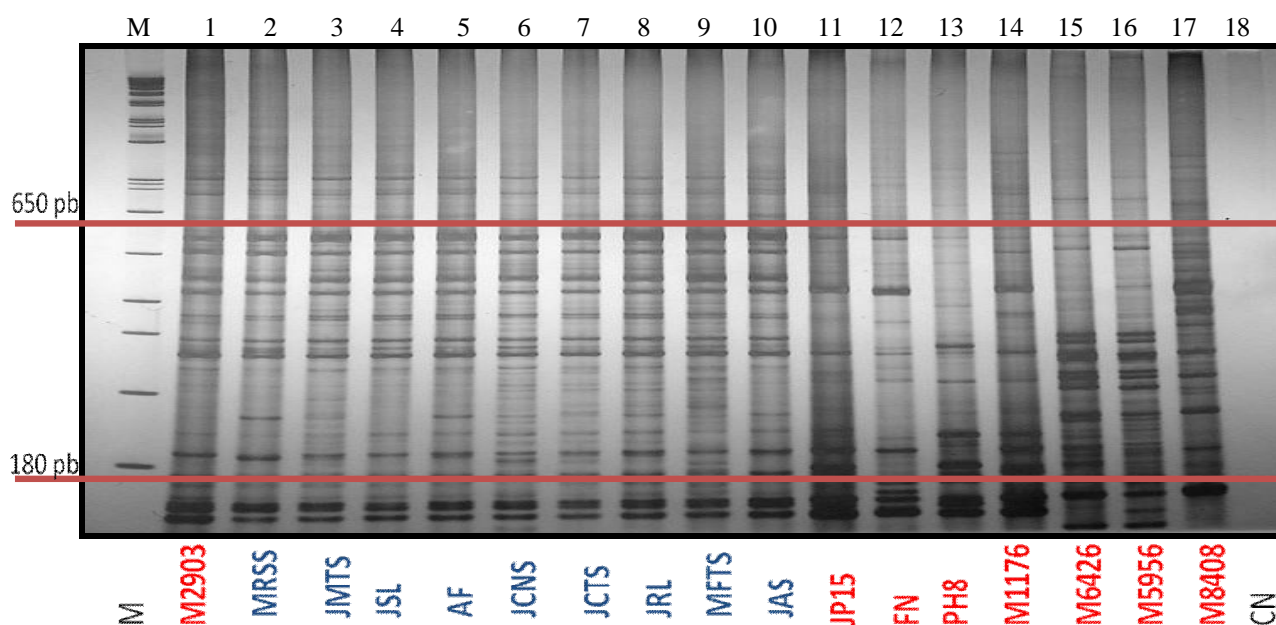
Figura 25: Fenograma gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador iniciador L15(996).



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

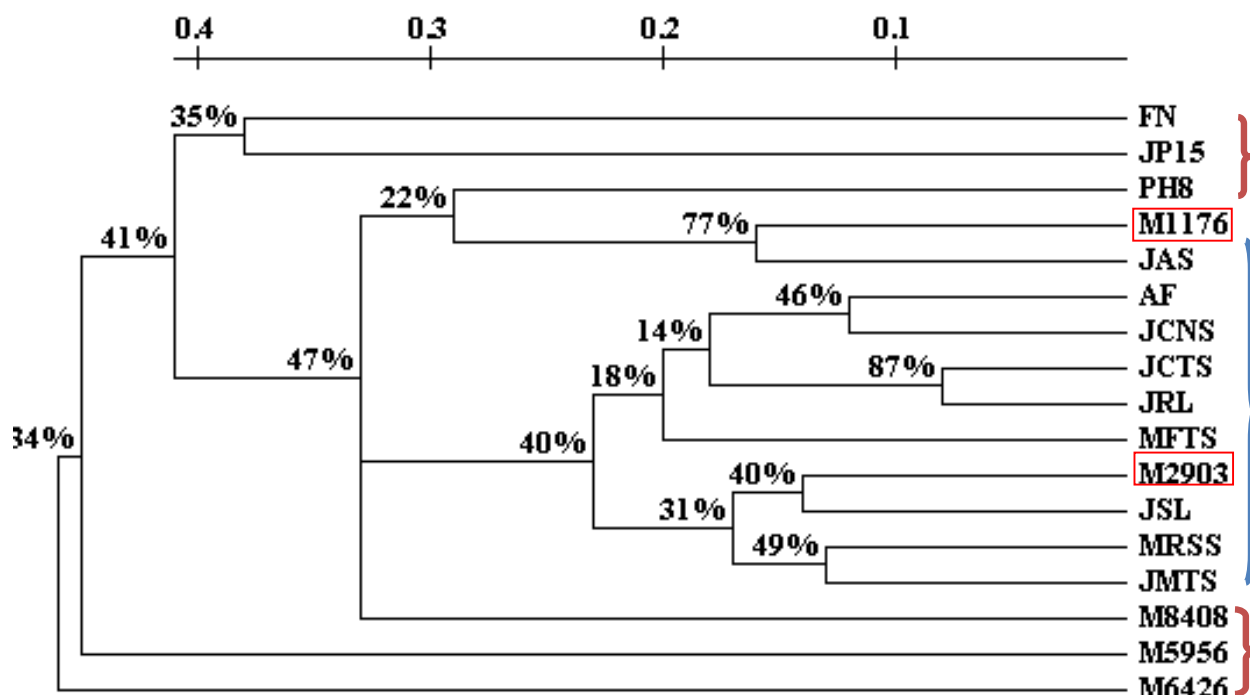
A amplificação do DNA dos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* com o iniciador P53 (NIGRO et al., 1989), esta documentada na figura 26. A área analisada no gel variou de 180pb a 650pb. Foram observados perfis diferentes para os diferentes isolados e cepas de referência utilizadas. Foi observado que, de forma semelhante aos outros iniciadores já citados, o isolado JCNS, oriundo da forma mucocutânea, mostrou um padrão mais diferenciado quando comparado com os demais isolados e cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* (M2903). A figura 27 mostra o fenograma de distância genética entre as amostras desenhadas utilizando o “Software” Treecon, analisadas sob o método UPGA. Foi observado que, de modo geral, os isolados formaram um grande grupo juntamente com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Porém pode-se observar que embora também próximo do grupo formado pelos outros isolados e a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*), o isolado JAS se comportou de forma diferenciada dos outros isolados e se agrupou com a cepa de referência M1176 (*L. guyanensis*) com um valor de *Bootstrap* significativo (77%). As outras cepas do subgênero *Viannia* se agruparam num único cluster e as cepas de referência PH8 (*L. (L.) amazonensis*) e FN (*L. (L.) major*) se mantiveram separadas, assim como a cepa JP15 (*L. (L.) chagasi*).

Figura 26: Perfil de RAPD de DNA genômico dos isolados de *L. (L.) braziliensis* estudadas, com o iniciador P53 em gel de poliacrilamida á 5%.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb (Invitrogen), 1-M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10-Isolados; 11- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN- controle negativo (sem DNA).

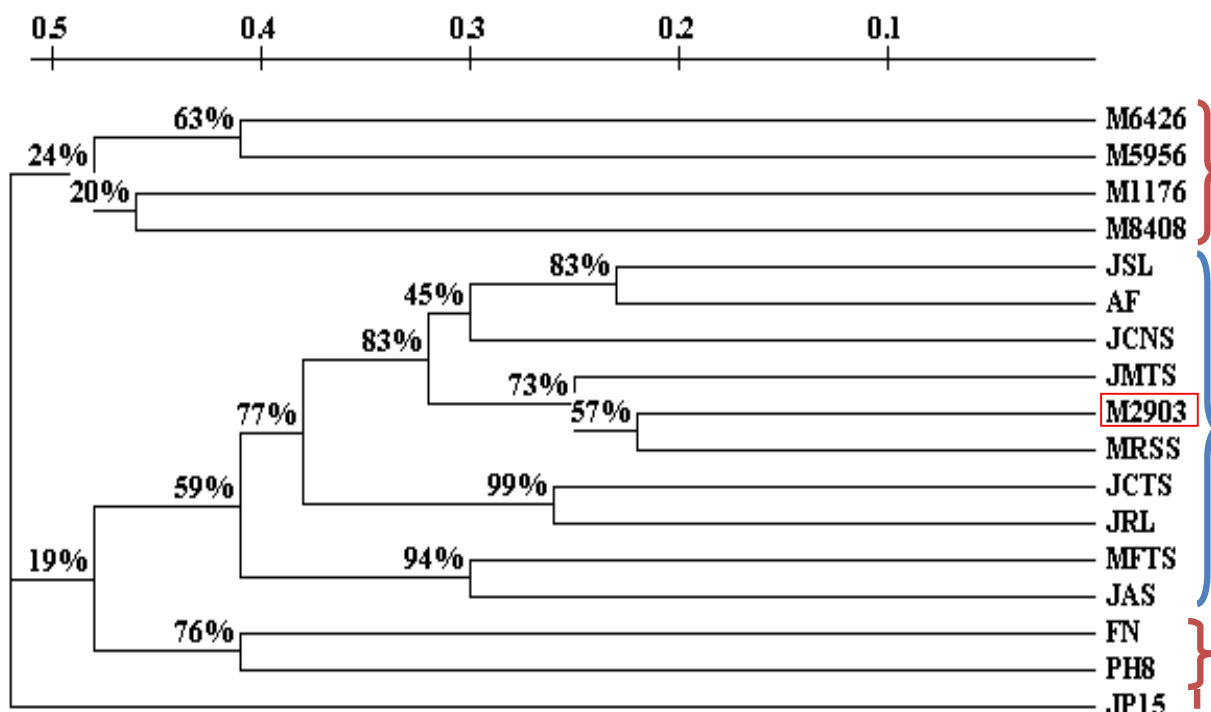
Figura 27: Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com o iniciador P53.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansoni*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

A figura 28 representa um fenograma consenso, gerado, com base na análise dos perfis de bandas das amostras obtidos pela técnica de RAPD-PCR com todos os iniciadores utilizados. Observou-se que os isolados agruparam-se num único cluster com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*), e os valores do *Bootstrap* foram consideravelmente significativos. Um dos dados mais relevantes fornecidos por esse fenograma foi de que os isolados AF e JSL ambos provenientes de pacientes com formas cutâneas disseminadas se agruparam mais próximas do que com os restantes dos isolados e cepa de referência, com um suporte de *Bootstrap* de 83%. O isolado JCNS proveniente da forma mucocutânea de um indivíduo do município de João Pessoa, se manteve mais distante dos demais isolados, porém ainda assim num mesmo cluster abrangendo a cepa de referência utilizada no estudo pra *L. braziliensis*. As outras cepas de referência formaram outros grupos. A cepa JP15 que representa a espécie *L. (L.) chagasi* ficou isolada em um cluster separado, das demais amostras.

Figura 28: Fenograma consenso gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores, P14, M13F-40, L15(996) e P53.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

No quadro 21, estão descritos os resultados das análises dos perfis de bandas amplificadas, utilizando o programa DNA-POP, onde foi possível identificar diferenças pela presença e ausência de bandas nas amostras. Observou-se que em relação à média geral de compartilhamento de bandas, obtidos com todos os iniciadores para a técnica de RAPD-PCR, os isolados de *L. (V.) braziliensis* compartilharam 62,63% de bandas. Esses dados demonstram diferenças genéticas entre estes isolados, pois indicam que 37,37% das bandas não foram compartilhadas entre os mesmos. De forma semelhante, quando comparados com a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*), a similaridade entre eles foi de 61,17%, traduzidos numa diferença de 38,83% de bandas não compartilhadas. Esse parâmetro também foi avaliado entre os isolados e as outras cepas do subgênero *Viannia* e observou-se uma percentagem de (bandas compartilhadas entre eles e com a cepa M2903 (*L. (L.) braziliensis*) menor, 41,7% e consequentemente 58,3% de bandas não compartilhadas com esses isolados.

A tabela 1 representa um resumo dos dados obtidos na análise das bandas pelo programa DNA-POP, com dados sobre o número de fragmentos amplificados das amostras estudadas, os números de fragmentos amplificados comuns entre dois Taxa e a média dos coeficientes de similaridades. Esse quadro reforça os dados encontrados nos estudos de polimorfismo com a técnica de RAPD-PCR com todos os iniciadores utilizados no fenograma consenso (Figura 28). Observou-se que os isolados AF e JSL ambas provenientes de lesões disseminadas, tiveram o maior percentual de bandas compartilhadas dentre os isolados, demonstrando maior índice de similaridade entre elas assim como foi observado no fenograma consenso. Também ficou demonstrado nesse quadro que o isolado que teve mais diferenças em relação a todos os outros isolados de *L. (V.) braziliensis* foi o JAS, proveniente de uma lesão cutânea localizada de um paciente com recidiva da doença e cujo tratamento com as drogas de referências foi falho. Esse isolado apresentou os menores índices de similaridade com todos os outros isolados assim como veio mostrando nos diferentes fenogramas gerados com alguns iniciadores na técnica de RAPD-PCR. Contudo o isolado MFTS, proveniente também de uma lesão cutânea localizada, foi o se revelou mais próximo do JAS, compartilhando mais características do com esse isolado. Apresentaram cerca de 64% de similaridade entre eles. Esses dados vão de acordo com os observados no fenograma consenso, em que esses dois isolados de *L. (V.) braziliensis* foram agrupados com um suporte de *Bootstrap* superior a 90%.

Quadro 21: Compartilhamento de bandas de DNA entre as cepas de *Leishmania* sp. Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, M13F-40, L15 e P53.

Iniciadores utilizados (RAPD-PCR)	Média do número de bandas entre todas as amostras* \pm DP	Média do número de bandas compartilhadas entre todas as amostras* \pm DP	Média da proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Média do número de bandas compartilhadas entre os isolados e a cepa M2903*** \pm	Média da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados e a cepa M2903***	Média do número de bandas compartilhadas entre os isolados	Média da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados	Média da proporção de bandas entre os isolados e as cepas do subgênero <i>Viannia</i> ***
L15	24,8 \pm 3,4	11 \pm 3,5	46%	12,44 \pm 1,6	52,33%	14,69 \pm 2,82	62,50%	41,33%
M13F-40	21,8 \pm 3,7	10,19 \pm 3,1	50%	11,23 \pm 3	52%	11,27 \pm 3,55	53,66%	44,38%
P14	32,2 \pm 6,2	16,0 \pm 5,5	50%	22,11 \pm 6,05	62,22%	19,53 \pm 6,05	55%	42,86%
P53	35,5 \pm 3,5	23,9 \pm 4,8	67%	29,44 \pm 3,2	78,11%	28,86 \pm 3,19	79,33%	61,47%
Médi ageral	28,52 \pm 4,2	15,27 \pm 16,9	53%	18,8 \pm 3,46	61,17%	18,59 \pm 3,91	62,63%	47,51%

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. *incluindo as amostras de referência da OMS: M2903, PH8, M1176, M5956, M8408, M6426 e a cepa JP15 previamente caracterizada como *L. (L.) chagasi*; DP: desvio padrão; ** M2903 (*L. (V.) braziliensis*), *** cepas do subgênero *Viannia*: M1176 (*L. (V.) guyanensis*), M5956 (*L. (V.) naiffi*), M6426 (*L. (V.) lansonii*) e M8408 (*L. (V.) shawi*).

Tabela 1- Número de bandas de DNA de amostras de *Leishmania* spp. detectadas por RAPD - PCR, entre **150 a 1650** pb com os iniciadores M13F-40, P14, P53, L15(966).

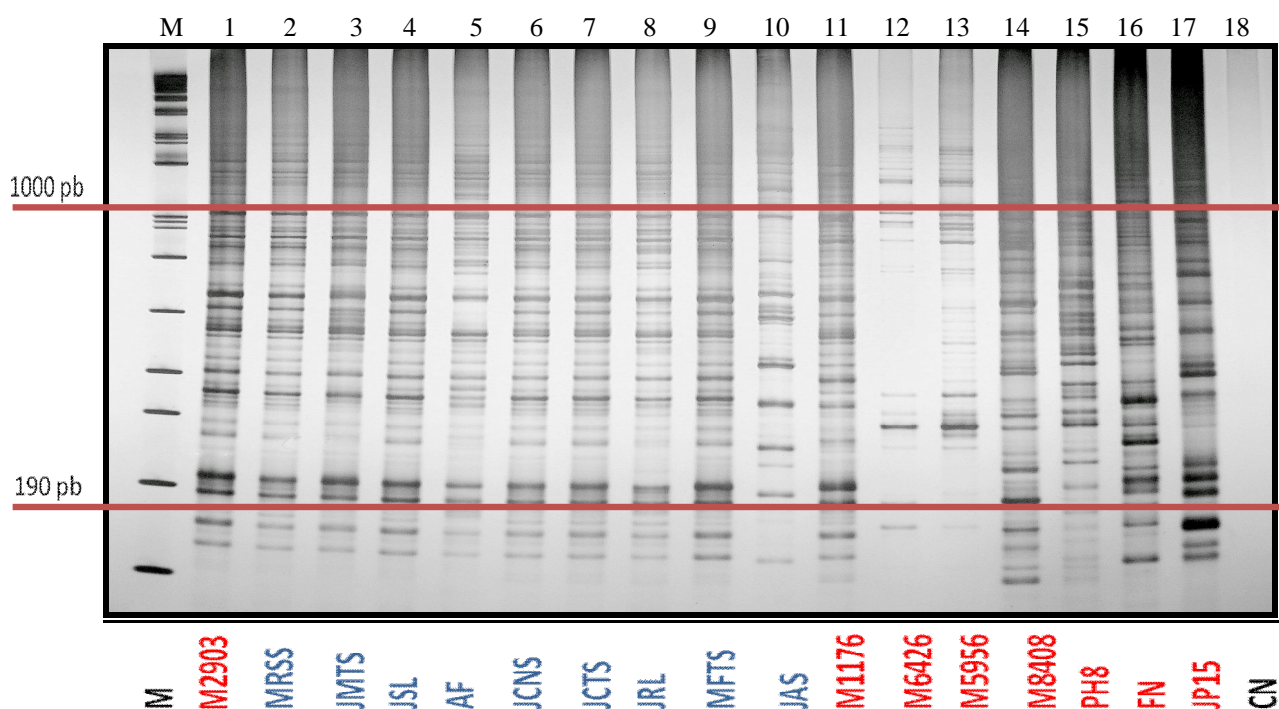
	M2903	MRR S	JMT S	JLS	AF	JCNS	JCTS	JRL	MFT S	JAS	M117 6	M642 6	M595 6	M840 8	FN	Ph8	JP15
M2903	122	0.74	0.72	0.68	0.60	0.63	0.53	0.53	0.53	0.59	0.45	0.41	0.49	0.48	0.53	0.55	0.48
MRSS	90	112	0.72	0.67	0.61	0.65	0.59	0.60	0.62	0.60	0.43	0.46	0.48	0.49	0.52	0.55	0.45
JMTS	88	85	114	0.74	0.70	0.70	0.59	0.58	0.56	0.54	0.46	0.44	0.49	0.46	0.51	0.52	0.50
JSL	75	83	91	125	0.75	0.76	0.59	0.60	0.58	0.59	0.51	0.45	0.51	0.50	0.41	0.51	0.49
AF	74	72	84	91	113	0.70	0.62	0.57	0.62	0.53	0.52	0.42	0.45	0.50	0.45	0.51	0.48
JCNS	80	79	86	95	85	122	0.65	0.65	0.60	0.55	0.47	0.40	0.48	0.46	0.46	0.53	0.50
JCTS	64	66	71	71	74	77	119	0.74	0.63	0.54	0.49	0.46	0.50	0.46	0.4	0.42	0.42
JRL	63	66	66	70	68	75	81	113	0.63	0.53	0.43	0.39	0.51	0.47	0.44	0.44	0.40
MFTS	70	74	73	75	74	78	65	72	113	0.64	0.54	0.42	0.43	0.50	0.47	0.48	0.44
JAS	71	69	65	72	62	69	61	59	79	115	0.54	0.41	0.52	0.47	0.49	0.46	0.44
M1176	54	50	54	60	56	57	54	48	67	63	106	0.51	0.56	0.54	0.42	0.42	0.41
M6426	48	51	50	52	48	48	49	42	48	46	54	103	0.61	0.48	0.43	0.45	0.43
M5956	58	54	57	55	53	57	56	55	57	69	61	65	109	0.57	0.52	0.47	0.41
M8408	56	54	54	59	55	55	51	51	72	49	57	50	61	103	0.50	0.45	0.42
FM	63	59	60	51	50	71	45	49	58	58	49	46	58	53	111	0.60	0.45
PH8	70	66	64	66	61	67	52	53	70	58	53	52	56	54	72	123	0.53
JP15	60	54	59	66	53	62	50	47	76	54	48	48	48	49	52	64	127

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números de fragmentos amplificados estão apresentados diagonalmente em negrito. Os números abaixo da diagonal representam os números de fragmentos amplificados comuns entre dois taxa. Os números acima da diagonal representam as médias dos coeficientes de similaridade.

4.5.2 Reação em cadeia da cadeia da polimerase ancorada a repetições de sequências simples (SSR- PCR)

A análise dos perfis gerados pelo iniciador K7 na reação de SSR-PCR está representada na figura 29. As áreas analisadas nos géis geraram fragmentos que variaram de 190 pb a 1000pb. Das amostras estudadas, todas amplificaram com o iniciador K7 e foram observados perfis diferentes entre os isolados e a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Dentre os isolados o JAS foi o que apresentou perfil de bandas mais distinto em relação aos outros isolados analisados e com a cepa de referência para *L. (V.) braziliensis* M2903.

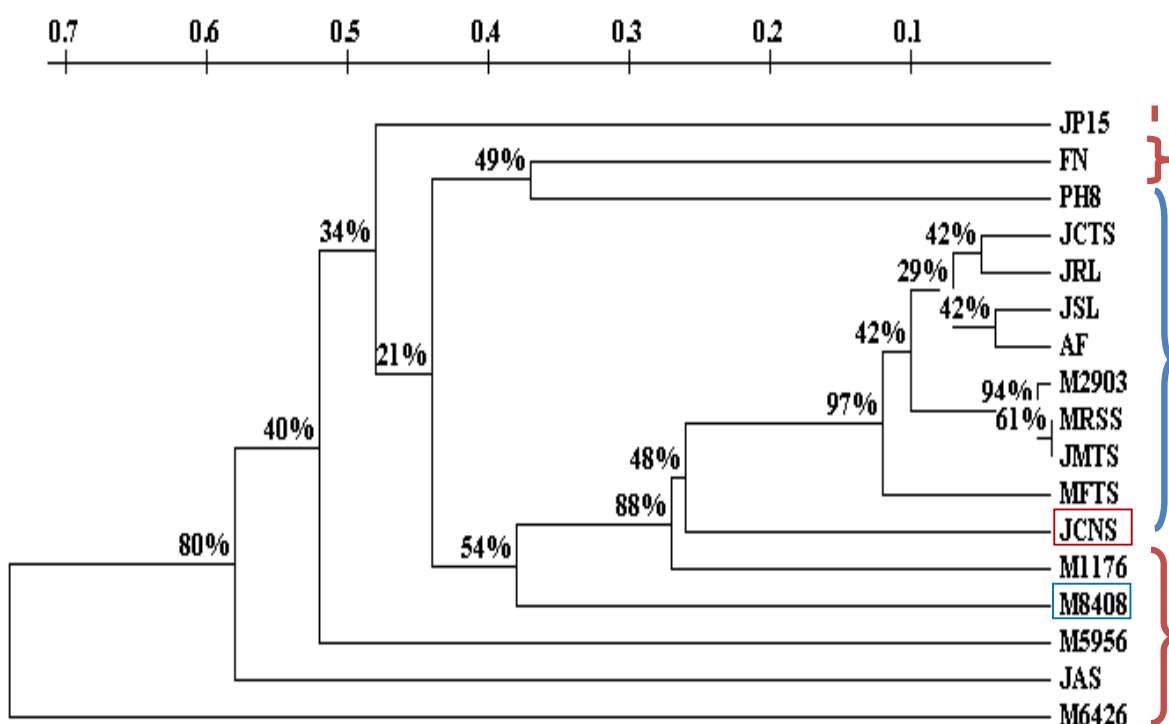
Figura 29: Perfil de SSR-PCR de DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudadas, com o iniciador K7 em gel de poliacrilamida a 5%.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M= marcador molecular de 1kb Invitrogen; 1- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 2-10; Isolados 11- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 12- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 13-M5956 (*L. (V.) naifi*); 14- M8408 (*L. (V.) shawi*); 15- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 16- FN (*L. (L.) major*); 17- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 18- CN- controle negativo (sem DNA).

A figura 30 representa o fenograma construído a partir da análise dos dados obtidos com os perfis de bandas gerados com o iniciador K7. Observou-se que a maioria dos isolados se agruparam em um único cluster com a cepa de referência de M2903 (*L. (V.) braziliensis*). O isolado JCNS compartilhou mais caracteres com a cepa de referência M1176 (*L. guyanensis*) se posicionando mais próxima a ela, mas ainda assim no mesmo cluster abrangendo a cepa de referencia para *L. (V.) braziliensis* M2903. O isolado JAS, se posicionou numa distância mais próxima das outras cepas do subgênero *Viannia*, embora também tenha sido agrupada no mesmo cluster que os outros isolados e a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*), com suporte de *Bootstrap* superior a 80%.

Figura 30- Fenograma gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de SSR-PCR com o iniciador iniciador K7.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

No quadro 22 estão descritos os resultados das análises dos perfis de bandas no programa DNA-POP com o iniciador K7. Verificou-se que com esse iniciador os isolados compartilharam entre si 84% de proporção de bandas, revelando diferenças genéticas que geraram 16% de bandas não compartilhadas. Em relação à cepa de referência de *L. (V.) brazilienis* (M2903), essa proporção de bandas compartilhadas foi de 86,7%, o que mostra que a similaridade genotípica dos isolados com esta cepa de referência. A análise entre os isolados e as outras cepas do subgênero *Viannia* realçam um maior percentual de diferenças genéticas, visto que compartilham 52,7% de bandas.

Quadro 22- Compartilhamento de bandas de DNA entre as cepas de *Leishmania* sp. Resultados obtidos com a técnica SSR-PCR com o iniciador K7.

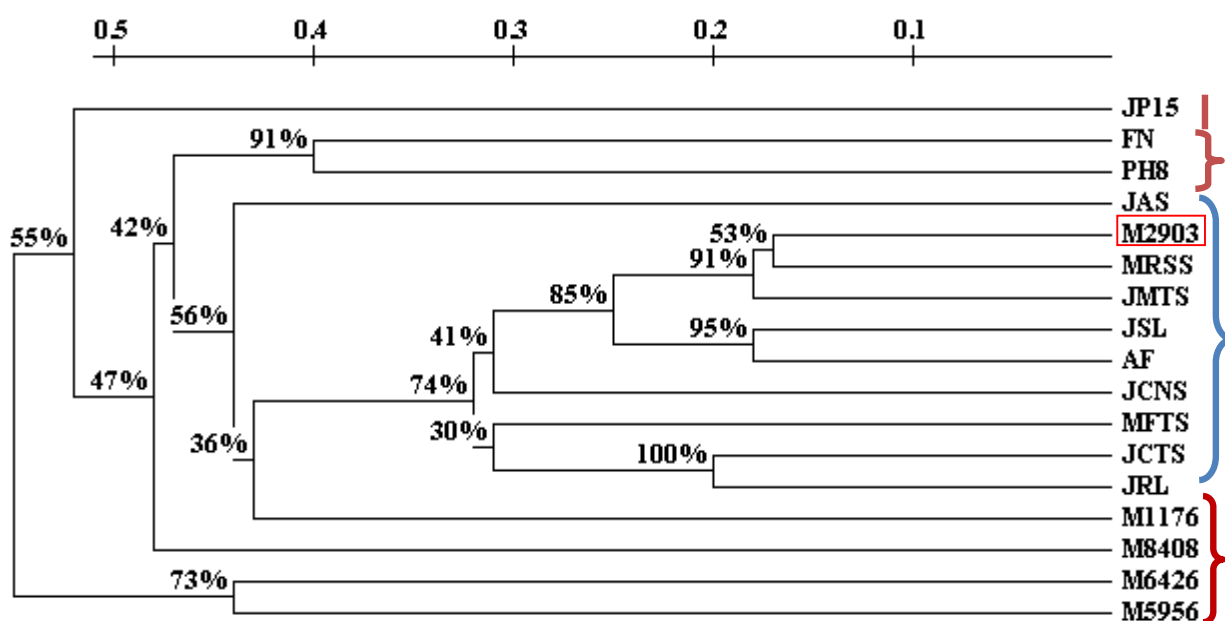
Iniciador	Média de bandas entre todas as amostras* ± DP	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras* ± DP	Média da proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Média de bandas compartilhadas entre os isolados e a cepa M2903* ± DP	Média da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados e a cepa M2903	Média de bandas compartilhadas entre os isolados ± DP	Média da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados	Média da proporção de bandas entre os isolados e do subgênero <i>Viannia</i> ***
K7	33,5 ± 6,6	21,7 ± 9,0	65 %	32 ± 5,35	86,7 %	30,5 ± 6,97	84%	52,7%

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. DP: desvio padrão, *incluindo as amostras de referência da OMS: M2903 (*L. (V.) braziliensis*), PH8 (*L. (L.) amazonensis*), M1176 (*L. (V.) guyanensis*), M5956 (*L. (V.) naiffi*), M6426 (*L. (V.) lansonii*) M8408 (*L. (V.) shawi*) e a cepa JPI5 previamente caracterizada como *L. (L.) chagasi*; DP: desvio padrão; ** M2903 (*L. (V.) braziliensis*), *** cepas do subgênero *Viannia*: M1176 (*L. (V.) guyanensis*), M5956 (*L. (V.) naiffi*), M6426 (*L. (V.) lansonii*) e M8408 (*L. (V.) shawi*).

4.5.2.1 Análise associada dos resultados obtidos por RAPD-PCR e SSR-PCR

Os dados obtidos com todos os iniciadores utilizados nas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR foram combinados para construir um fenograma consenso por UPGMA, pelo programa Treecon (Figura 31). O fenograma gerado com os resultados destas duas técnicas mostrou grande similaridade com aqueles construídos com base nos produtos de RAPD-PCR e SSR-PCR, revelando o agrupamento entre as amostras isoladas de casos humanos e a cepa de referência M2903 com 74% de suporte pelo *Bootstrap*. Além disso os isolados da forma disseminada AF e JSL, se agruparam novamente, com um suporte de *Bootstrap* superior a 90% e e compartilharam a menor distância genética dentre os isolados, se revelando mais próximos entre eles.

Figura 31: Fenograma consenso gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de RAPD e SSR-PCR.



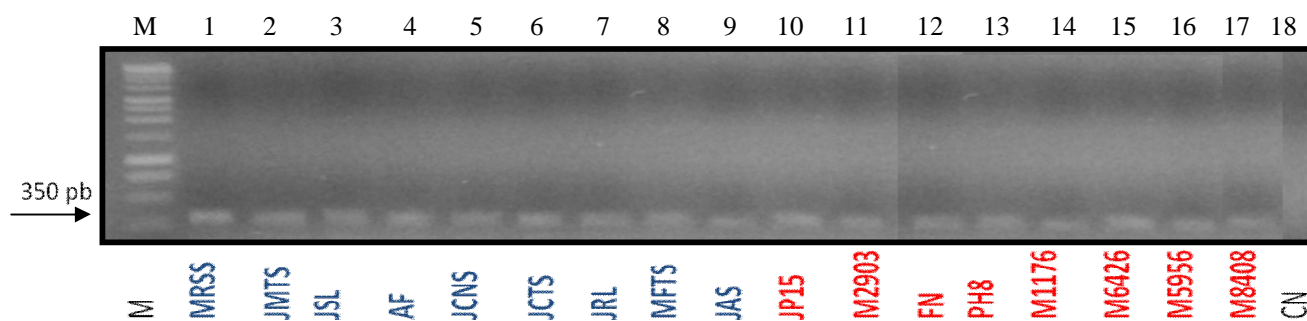
Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

4.5.3 PCR-RFLP

4.5.3.1 Amplificação e digestão da região ITS₁ de rDNA (PCR-RFLP / HaeIII)

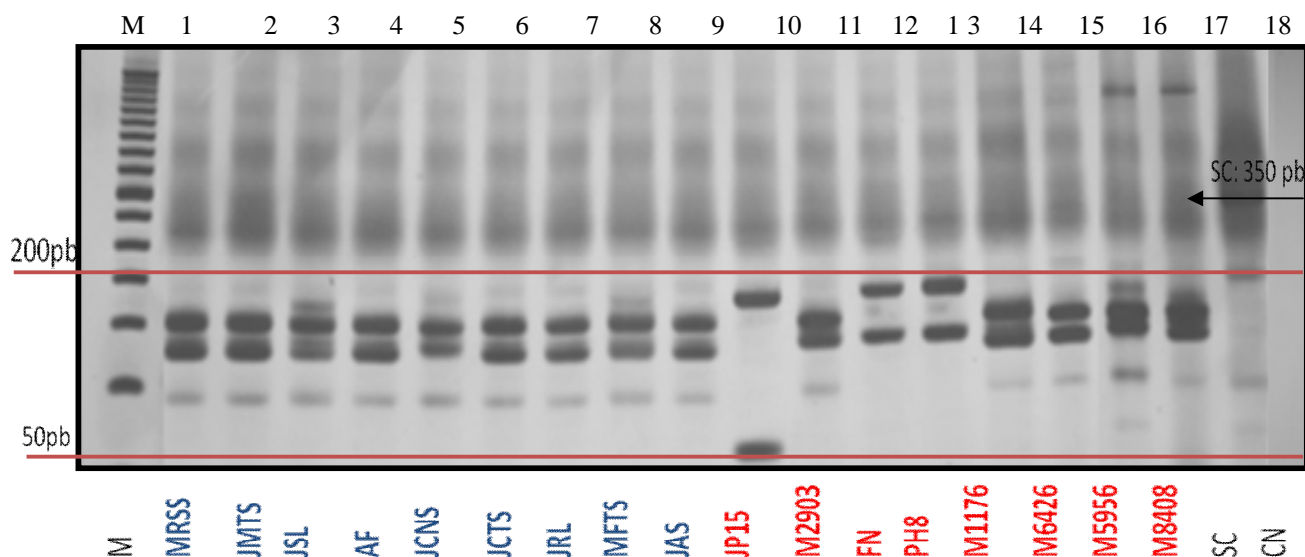
A amplificação da região espaçadora transcrita ITS₁ do gene do rDNA gerou fragmentos de aproximadamente 300pb a 350pb, dependendo da amostra amplificada (Figura 32). A digestão dos produtos amplificados da região ITS₁, com a enzima de restrição HaeIII está representada na figura 33. Foram encontrados dentre os isolados, cinco perfis de restrição para ITS₁-HaeIII.

Figura 32: Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação da região ITS₁ do rDNA dos isolados de *L. braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: Marcador Molecular (100pb Promega); 1-9 Isolados; 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*); 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12- FN (*L. (L.) major*); 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8408 (*L. (V.) shawi*); 18- CN: controle negativo (sem DNA).

Figura 33: Perfil de restrição da região ITS₁ do rDNA dos isolados de *L. (V.) braziliensis* com Hae III em gel em poliacrilamida (5%).



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: Marcador Molecular (50pb Promega); 1-9 isolados; 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*), 12- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 13- FN (*L. (L.) major*), 14- PH8 (*L. (L.) amazonensis*), 15- M1176 (*L. (V.) guyanensis*), 16- M6426 (*L. (V.) lansonii*), 17- M5956 (*L. (V.) naifi*), M8408 (*L. (V.) shawi*), 18- CN: controle negativo (sem DNA).

Os isolados MRSS, JMTS, AF, JCTS, JRL apresentaram o mesmo perfil de bandas e os isoaldos JSL, JCNS, MFTS e JAS tiveram, cada um, perfis de bandas distintos. Contudo estes perfis de bandas foram mais semelhantes com as da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) do que as demais cepas estudadas. No quadro 23 observou-se que os isolados apresentaram uma média de 84,7% de similaridade com a cepa M2903 e 87% de similaridade entre si.

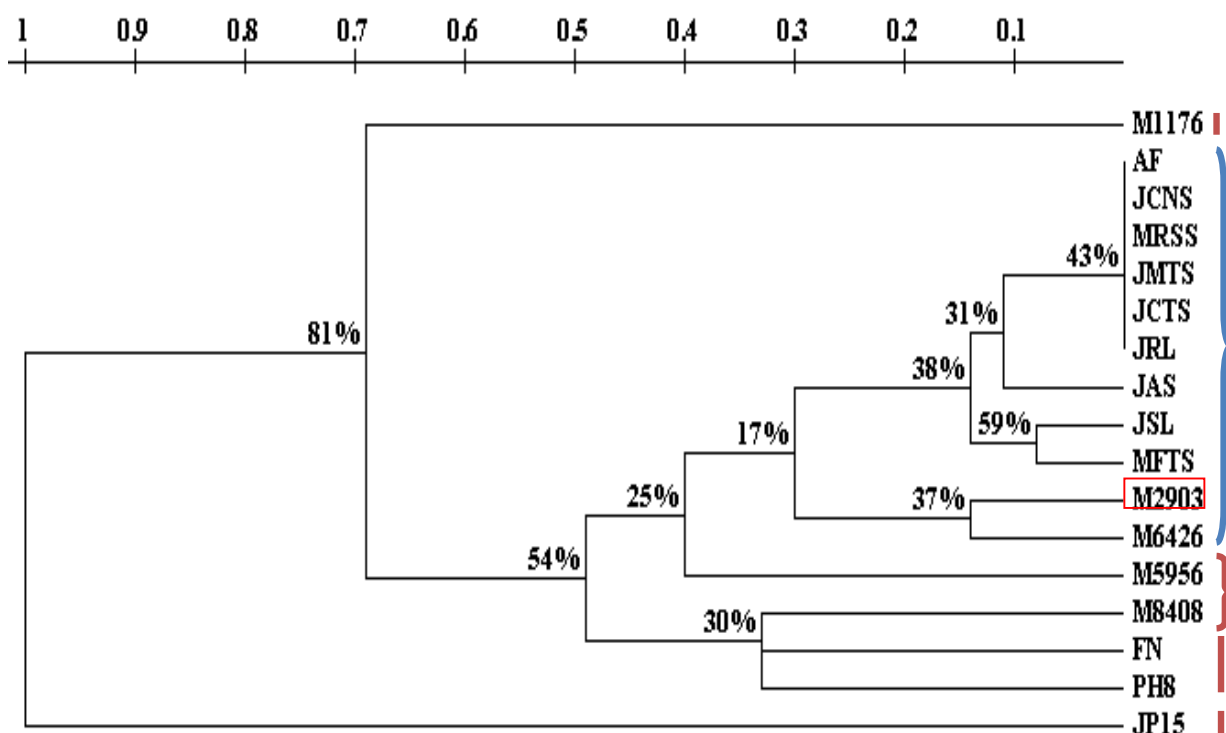
No fenograma da figura 34 esta representada a análise do perfil de restrição da região ITS₁/HaeIII é mostrado que os isolados agruparam-se todos num mesmo cluster muito próximo da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*).

Quadro 23- Médias do número de bandas compartilhadas entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* na técnica de RFLP-PCR, com os iniciadores LITSR/ L5.8S.

Iniciador	Media da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados e a cepa de M2903* \pm DP	Média da proporção de bandas entre os isolados	Média da proporção de bandas entre os isolados e as cepas do complexo <i>Viannia</i> **
LITSR/L5.8S	84%	87%	53,62%

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. DP: desvio padrão, * M2903 (*L. (V.) braziliensis*) ** cepas do subgênero *Viannia*: M1176 (*L. (V.) guyanensis*), M5956 (*L. (V.) naifi*), M6426 (*L. (V.) lansonii*) e M8408 (*L. (V.) shawi*).

Figura 34: Fenograma gerado pelo método UPGMA, programa TREECON, com a técnica de PCR-RFLP, do ITS₁ do rDNA digerida por HaeIII.

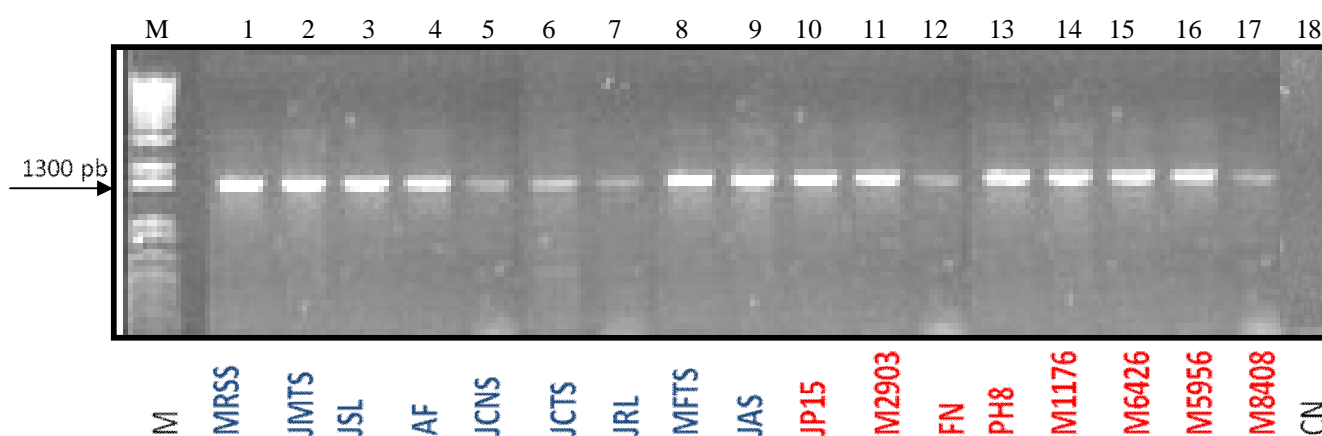


Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

4.5.4 Amplificação e digestão da região *hsp70* (PCR-RFLP/ BstUI)

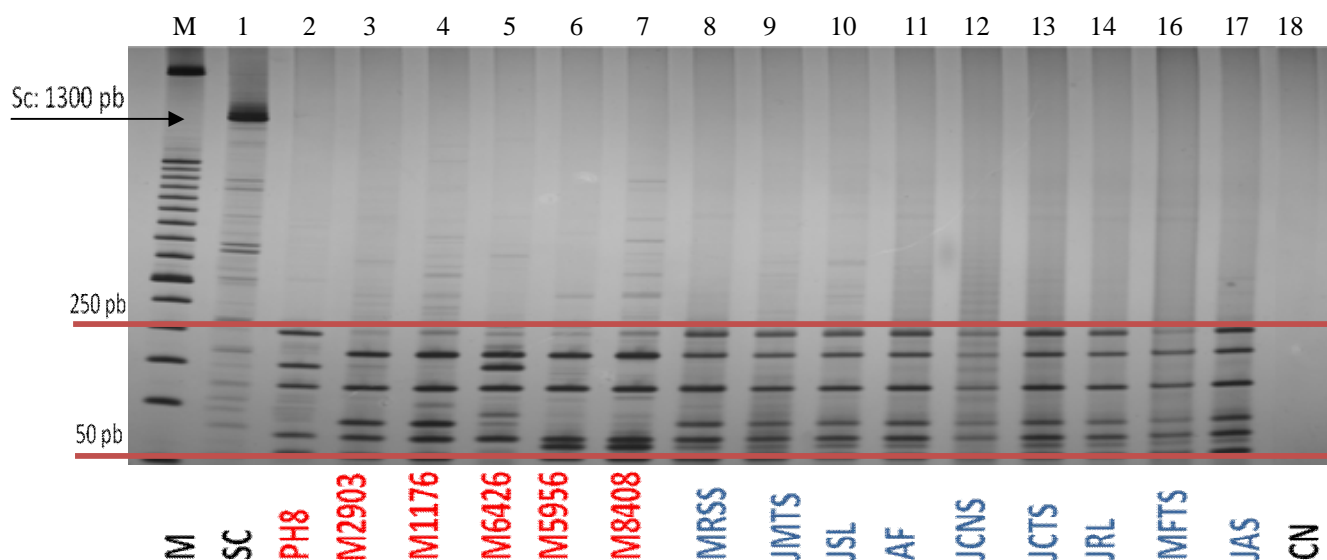
A amplificação da região *hsp70* gerou fragmentos de DNA de aproximadamente 1300pb para todas as amostras estudadas (Figura 35). A figura 36 representa os produtos da digestão do gene *hsp70* com a enzima de restrição BstUI para todas as amostras. Os perfis de restrição, apresentaram diferenças entre as isolados de *L. (V.) braziliensis* podendo ser agrupados em 5 perfis diferentes.

Figura 35: Gel de agarose (1%), mostrando a amplificação da região *hsp70* dos isolados de *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: marcador molecular 1kb Invitrogen; 1-9 Isolados; 10- JP15 (*L. (L.) chagasi*), 11- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 12- FN (*L. (L.) major*), 13- PH8 (*L. (L.) amazonensis*), 14- M1176 (*L. (V.) guyanensis*), 15- M6426 (*L. (V.) lansonii*), 16- M5956 (*L. (V.) naifi*); 17- M8401 (*L. (V.) shawi*); 18- CN: controle negativo (sem DNA).

Figura 36: Perfil de restrição da região *hsp70* do DNA gênomico dos isolados de *L. braziliensis* com BstUI em gel de poliácridamida (5%).



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. M: Marcador Molecular (50pb Promega), 1- SC: Banda amplificada com os iniciadores p/ ITS1 sem corte com a enzima; 2- PH8 (*L. (L.) amazonensis*); 3- M2903 (*L. (V.) braziliensis*); 4- M1176 (*L. (V.) guyanensis*); 5- M6426 (*L. (V.) lansonii*); 6- M5956 (*L. (V.) naifi*); 7- M8401 (*L. (V.) shawi*); 8- 17 isolados; 18- CN: controle negativo (sem DNA).

Os isolados JSL, AF, JCTS, JRL, MFTS apresentaram o mesmo perfil de bandas e os isolados, MRSS, JMTS, JCNS e JAS, tiveram perfis de bandas distintos.

No quadro 24 estão descritos as médias do número de bandas compartilhadas entre as cepas de *L. (V.) braziliensis*. Observou-se que os isolados apresentaram uma média de 69,75% de similaridade entre si, traduzidos em 30,25% de bandas não compartilhadas entre os isolados e 65,78% bandas compartilhadas com a cepa M2903 o que significa que 34,22% de bandas não compartilhadas. Contudo Por outro lado verificou-se que a proporção de bandas compartilhadas entre esses isolados e a as outras espécies do subgênero *Viannia* foi 70,58%, demonstrando 29,48% de proporção de bandas não compartilhadas.

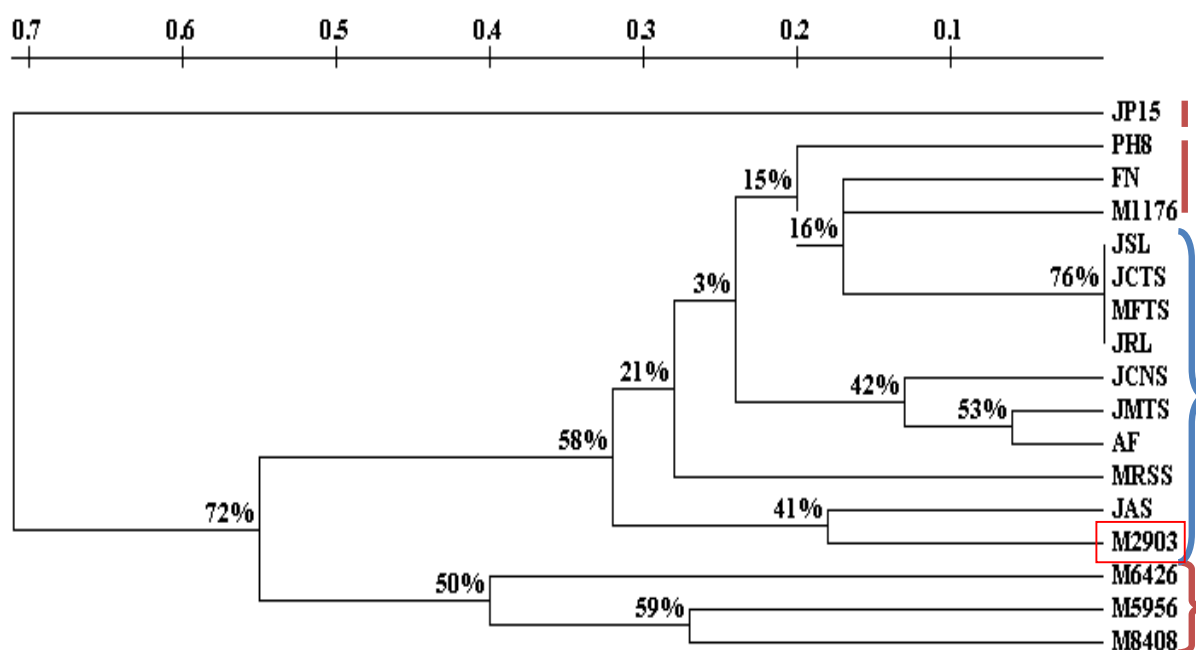
A figura 37 representa o fenograma gerado pela análise do perfil de restrição da região do gene *hsp70*, com a enzima BstUI. Os isolados se agruparam de forma próxima entre si com a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Contudo observa-se que a distância entre esses isolados variou.

Quadro 24- Médias do número de bandas compartilhadas entre os isolados de *L. (V.) braziliensis*. Resultados obtidos com a técnica de RFLP-PCR, da região *hsp70* com os iniciadores **hsp70 for/ hsp70 rev**.

Iniciador	Média da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados e a cepa M2903*	Média da proporção de bandas compartilhadas entre os isolados	Média da proporção de bandas entre os isolados e as cepas do complexo Viannia**
hsp70 for/ hsp70 ver	65,78%	69,75%	70,58%

Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. DP: desvio padrão, * M2903 (*L. (V.) braziliensis*),** cepas do subgênero *Viannia*: M1176 (*L. (V.) guyanensis*), M5956 (*L. (V.) naifi*), M6426 (*L. (V.) lansonii*) e M8408 (*L. (V.) shawi*).

Figura 37: Fenograma gerado pelo método UPGMA programa TREECON, com a técnica de PC- RFLP da região *hsp70* digerida pela enzima BstUI.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os números nos braços indicam as percentagens de 1000 reamostragens pelo teste *bootstrap*. ● Cepa de referência: M2903 (*L. (V.) braziliensis*); JP15 (*L. (L.) chagasi*); FN (*L. (L.) major*); PH8 (*L. (L.) amazonensis*); M1176 (*L. (V.) guyanensis*); M6426 (*L. (V.) lansonii*); M5956 (*L. (V.) naifi*); M8408 (*L. (V.) shawi*). ● Isolados.

4.6 Caracterização fenotípica dos isolados de *L. (V.) braziliensis*

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram estudados fenotipicamente em relação ao crescimento das formas promastigotas em meio de cultivo e sensibilidade a drogas de referência.

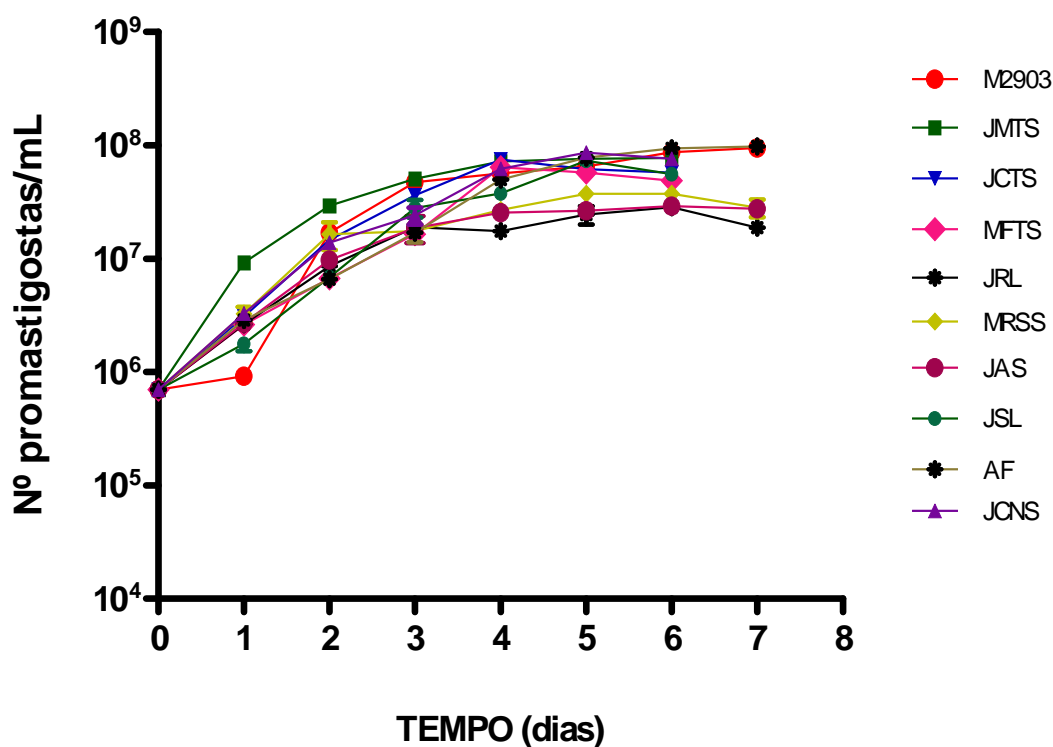
4.6.1 Perfil de crescimento das formas promastigotas dos diferentes isolados de *L. braziliensis* em meio de culturas

A partir de uma cultura em fase logarítmica de crescimento, promastigotas dos isolados de *L. (V.) braziliensis* foram repicados em meio de cultura e incubados a 25 °C. Posteriormente, a cada 24 horas foi quantificado número de células em câmara até a fase estacionária de crescimento.

O gráfico 1 mostra o perfil de crescimento de todos os isolados estudados e da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). A maioria dos isolados apresentaram um perfil semelhante. Contudo foram detectadas diferenças entre alguns isolados, quanto ao tempo em que atingiram a fase estacionária de crescimento e ao número de parasitos obtidos em cultura. Foi observada uma intensa proliferação dos parasitos entre os 1º e 4º ou 5º dias das culturas, correspondente a fase logarítmica do crescimento. Dependendo do isolado, a partir do 4º ou 5º dia de cultivo, a proliferação dos parasitos diminuiu, iniciando a fase estacionária do crescimento. Os isolados JCTS, MFTS e JMTS permaneceram em fase logarítmica de crescimento até o 4º dia de cultivo; os demais permaneceram nesta fase até o 5º dia.

Foi realizada a análise estatística do crescimento das culturas nos diferentes tempos e observou-se diferenças entre os isolados e entre estes e a cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* (M2903). A partir do 4º dia de cultivo, observou-se um crescimento significativamente diferenciado de todas as culturas, tanto em relação a cepa de referência M2903, como entre os próprios isolados. Os dados mais relevantes foram observados pela cepa de referência e pelo isolado JMTS que mostraram um maior crescimento que os demais isolados desde o 1º dia cultivo. Dentre os isolados de *L. (V.) braziliensis*, pode-se observar no sexto dia de cultivo, a seguinte ordem decrescente de crescimento foi o AF (LCDS), JCNS (LMC), JMTS (LCL), JSL (LCDS), JCTS (LCL), MFTS (LCL), MRSS (LCL) e JAS (LCL).

Gráfico 1: Curva de crescimento dos isolados de *L. (V.) braziliensis* estudados e da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*).



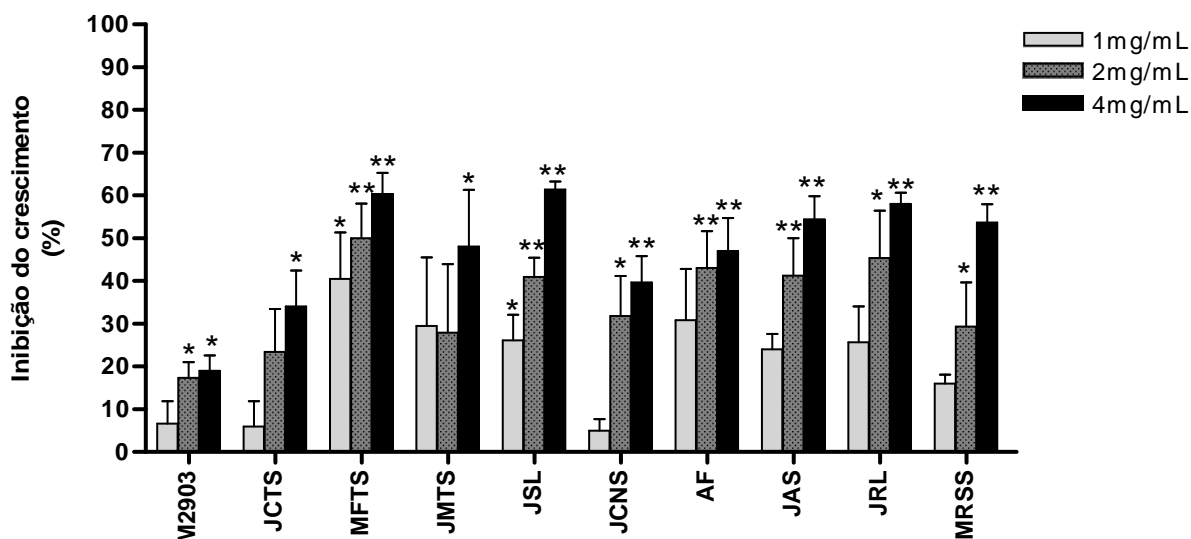
Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (7×10^5 células/mL) foram cultivadas em garrafas contendo 35 mL em meio bifásico NNN/Schneider suplementado com 20% de SBF e incubadas à temperatura de 25°C e examinadas qualitativa e quantitativa ao microscópio óptico diariamente. Estes dados representam a média de duplicata de um experimento.

4.6.2 Sensibilidade dos isolados de *L. (V.) braziliensis* a das drogas de referência

No gráfico 2 está representado o resultado da análise da atividade antipromastigota do antimônio pentavalente (Glucantime[®]), sobre os diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Foram testadas as concentrações de 1, 2 e 4mg/ml. Estes dados representam uma média de três experimentos realizados independentemente. A atividade desta droga foi analisada comparativamente entre os diferentes isolados e, entre estes e a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Observou-se que quando comparados com o controle (sem droga), todas as culturas foram sensíveis. O único isolado que foi sensível em todas as concentrações

utilizadas foi o MFTS, todas as outras foram sensíveis a concentrações igual ou superior a 2mg/mL.

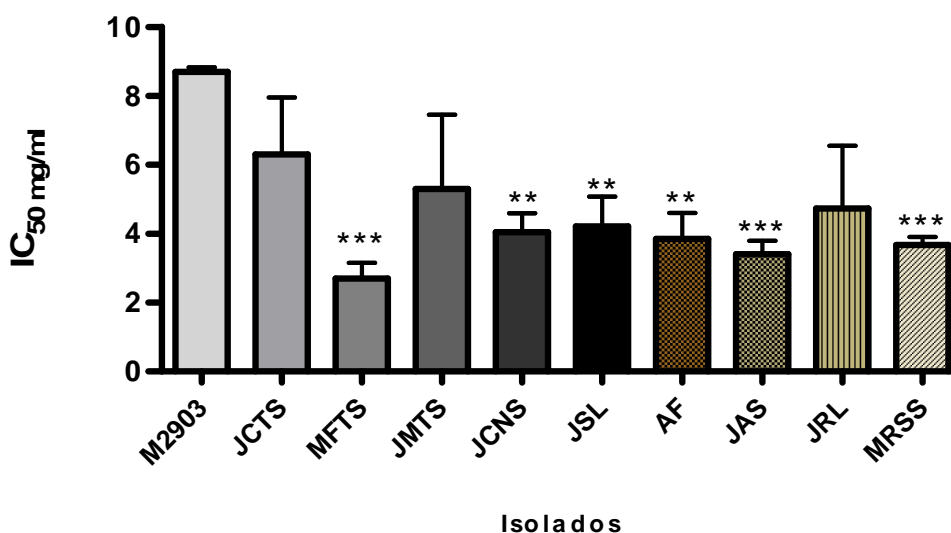
Gráfico 2: Atividade antipromastigota do antimônio pentavalente (Glucantime - Sb^V), sobre a cepa de referência M2903 (*L. braziliensis*) e os isolados de *L. braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (1×10^6 células/mL) foram cultivados em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C. O gráfico representa à média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para comparar as diferentes concentrações, foi o teste “t” foi sendo * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

O gráfico 3 representa os valores de IC₅₀ gerados pela atividade antipromastigota do antimônio pentavalente (Glucantime). Quando comparada a sensibilidade da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) ($8190 \pm 0,13$ µg/mL) com a dos isolados verificou-se que apenas os valores gerados por JCTS ($6300 \pm 1,64$), JMTS ($5300 \pm 2,15$ µg/mL) e JRL ($4730 \pm 1,81$ µg/mL) não foram diferentes ($P < 0,05$) sendo igualmente sensíveis. Os outros isolados foram mais sensíveis do que a cepa de referência ao Antimônio pentavalente. Entre os isolados não houve diferença significativa em relação aos IC₅₀ gerados. Todos eles se comportaram de forma semelhante, sendo todas igualmente sensíveis para essa droga ($P > 0,05$).

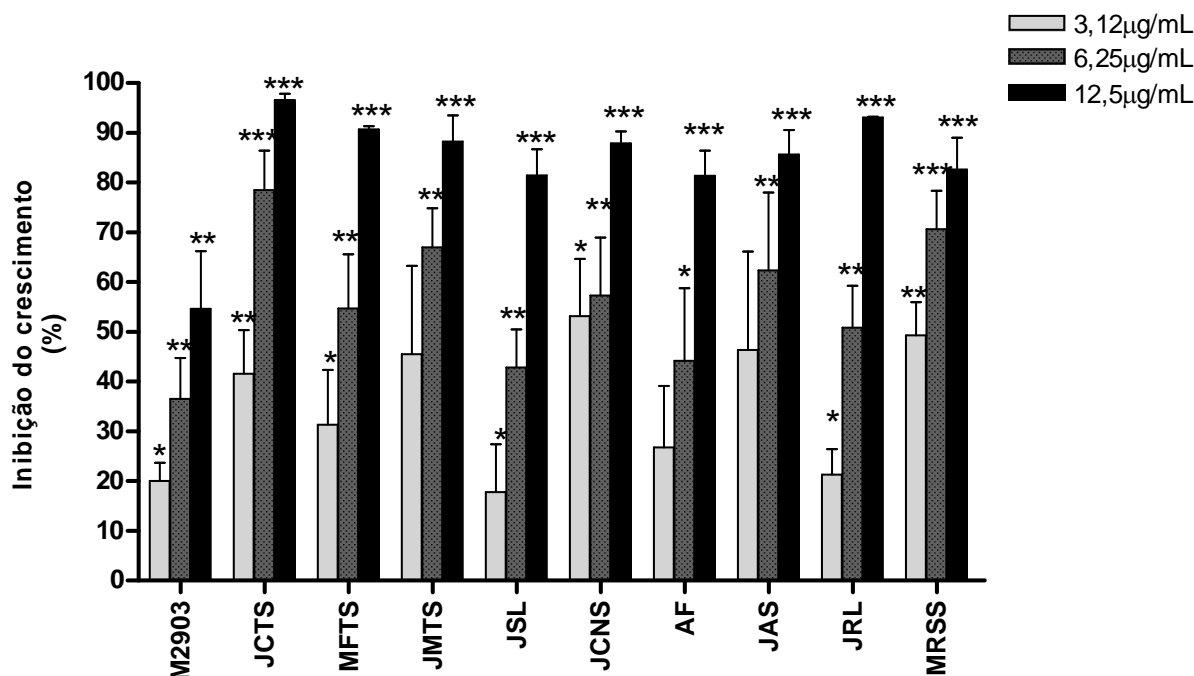
Gráfico 3: Concentração do antimônio pentavalente (Glucantime - Sb^{V}) que inibe 50% do crescimento (IC_{50}) da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e dos isolados de *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Para análise estatística foi utilizado o teste “t” para comparação entre as amostras, sendo ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação a cepa de referência).

No gráfico 4 está representado o resultado da análise da atividade antipromastigota do antimônio trivalente (Sb^{III}), sobre os diferentes isolados de *Leishmania* sp. A atividade desta droga sobre os isolados foi analisada comparativamente entre os diferentes isolados e a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Verificou-se que todas as culturas analisadas foram sensíveis ao antimônio trivalente, mostrando uma inibição do crescimento dependente da dose.

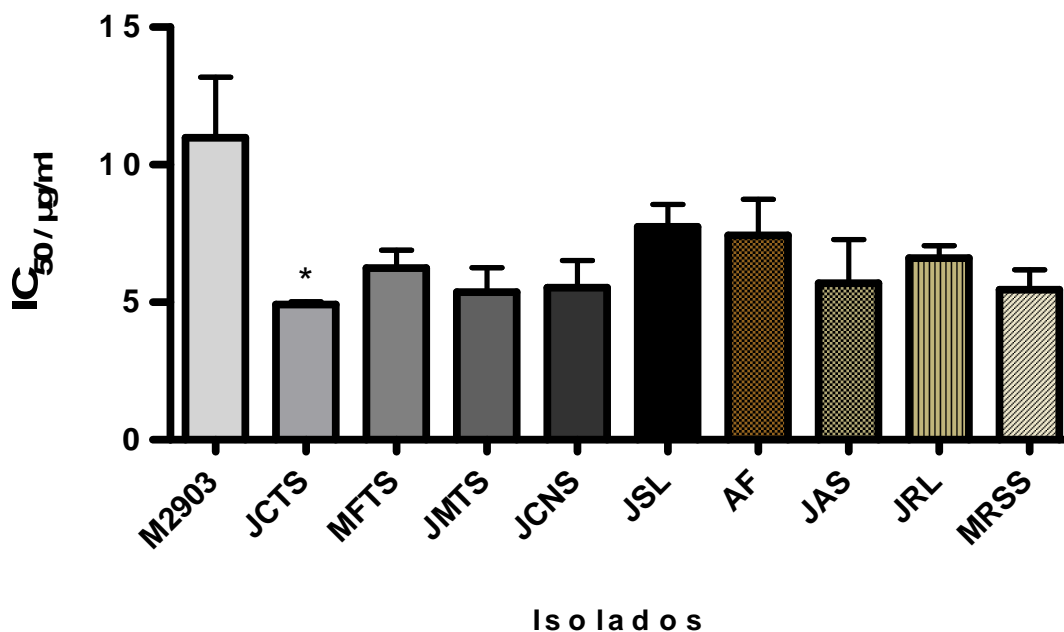
Gráfico 4: Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (Sb^{III}), sobre a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e os isolados de *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (1×10^6 células/mL) foram cultivados em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C. O gráfico representa à média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para comparar as diferentes concentrações, foi o teste “t” foi sendo * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

O gráfico 5 representa os valores de IC_{50} gerados pela atividade antipromastigota do antimônio trivalente em estudo. Quando comparada a sensibilidade dos isolados de *L. (V.) braziliensis* com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) ($IC_{50} = 10,99 \pm 2,19$ µg/mL), foi observado que apenas o isolado JCTS ($IC_{50} = 4,91 \pm 0,10$ µg/mL) foi mais sensível ao antimônio trivalente ($P > 0,05$). Quando a comparação foi realizada entre os isolados observou-se que o isolado JCTS ($IC_{50} = 4,91 \pm 0,10$ µg/mL) foi mais sensível do que os isolados JSL ($IC_{50} = 7,74 \pm 0,81$ µg/mL) e JRL ($IC_{50} = 6,61 \pm 0,44$ µg/mL). Os outros isolados se comportaram de forma semelhante entre si, sendo igualmente sensíveis ao antimônio trivalente ($P > 0,05$).

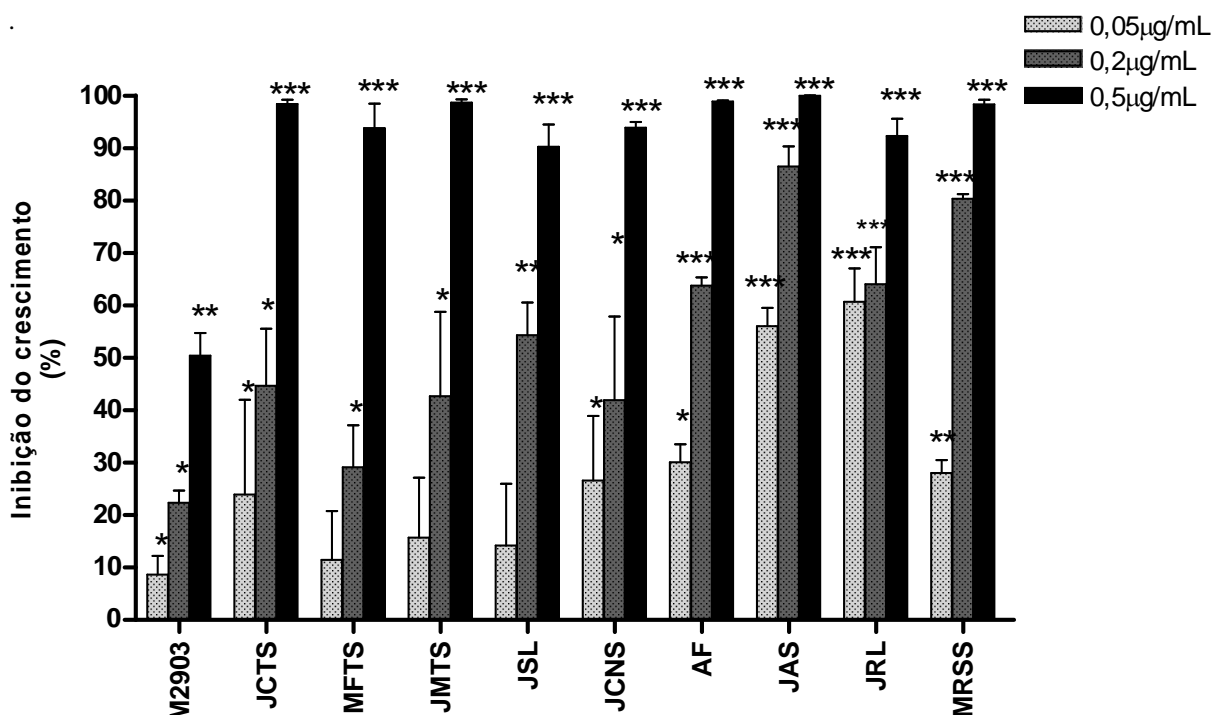
Gráfico 5: Concentração do antimônio trivalente (Sb^{III}) que inibe 50% do crescimento (IC_{50}) da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e dos isolados de *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Para análise estatística foi utilizado o teste “t” para comparação entre as amostras, sendo * $P \leq 0,05$ (Significância em relação a cepa de referência).

No gráfico 6 está representado o resultado da análise da atividade antipromastigota da droga de referência Anfotericina B, sobre os diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. A atividade antipromastigota desta droga sobre os isolados também foi analisada comparativamente entre os diferentes isolados e a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Verificou-se que todas as culturas analisadas foram sensíveis ao Anfotericina B, mostrando uma inibição do crescimento dependente da dose.

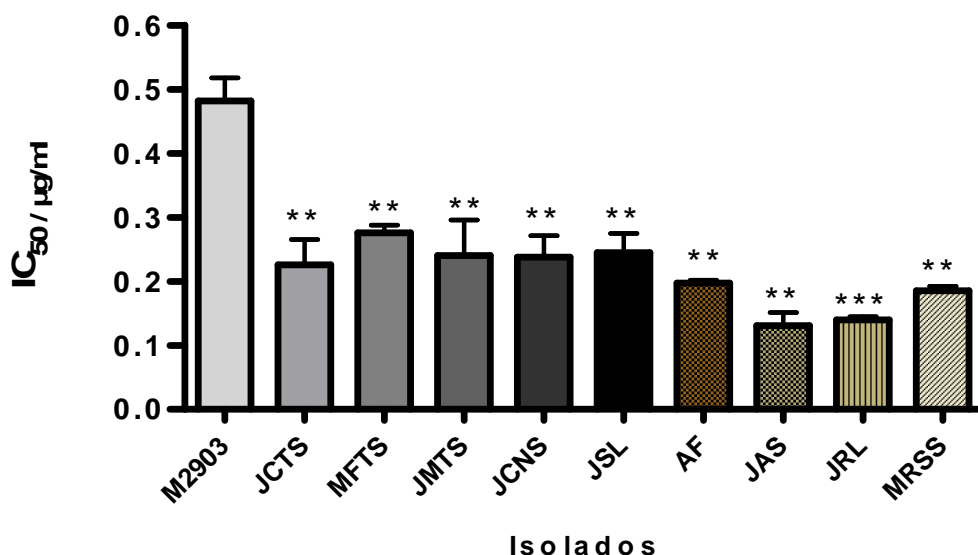
Gráfico 6: Atividade antipromastigota da Anfotericina B, sobre a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e os isolados de *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Os parasitos (1×10^6 células/mL) foram cultivados em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C. O gráfico representa à média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para comparar as diferentes concentrações, foi o teste “t” foi sendo * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

No gráfico 7 está representada os valores de IC_{50} gerados pela atividade antipromastigota da Anfotericina B. Quando comparado o valor de IC_{50} da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) ($IC_{50} = 0,48 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) com os dos isolados, observou-se que todos eles tiveram valores significativamente menores de IC_{50} ($P < 0,05$), se revelando sensíveis a essa droga do que a cepa de referência. Entre os isolados, foi detectadas diferenças em relação à sensibilidade a anfotericina B. Foi observado que os isolados JRL ($IC_{50} = 0,13 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$) e JAS ($IC_{50} = 0,13 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) foram os mais sensíveis a essa droga quando comparados com todos os outros isolados ($P < 0,05$). Foi também observado que os isolados AF ($IC_{50} = 0,19 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$) e MRSS ($IC_{50} = 0,18 \pm 0,006 \mu\text{g/mL}$) foram mais sensíveis do que o isolado MFTS ($IC_{50} = 0,27 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) com valores de IC_{50} significativamente menores ($P < 0,05$).

Gráfico 7: Concentração do antimônio trivalente (Sb^{III}) que inibe 50% do crescimento (IC_{50}) da cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) e dos isolados de *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Rodrigues, Y. K. S., 2012. Para análise estatística foi utilizado o teste “t” para comparação entre as amostras, sendo ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação cepa de referência).

Considerando a atividade antipromastigota das drogas de referência Antimônio pentavalente (Sb^V) e o trivalente (Sb^{III}) e Anfotericina B, pode-se resumir que todos os isolados foram sensíveis a estas drogas estudadas. A análise comparativa revelou algumas diferenças na sensibilidade ao antimônio trivalente e anfotericina B entre os isolados de *L. (V.) braziliensis*.

5. DISCUSSÃO

5 Discussão

Endêmicas em 88 países as leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, ocupando a sexta colocação no grupo das parasitoses negligenciadas, com cerca de 12 milhões de pessoas contaminadas em todo mundo (WHO, 2012; DESJEUX, 2004, HOTEZ et al., 2007).

As leishmanioses apresentam um vasto quadro de espectro clínico e dentre elas, estão as formas tegumentares da doença. No Brasil, a LTA constitui-se uma das maiores afecções dermatológicas públicas no país, sendo registradas em todas as 27 federações brasileiras (BRASIL, 2010a). Dados demonstram que no período entre 2000-2009, o Brasil confirmou cerca de 260 mil casos de LTA, sendo que a maior incidência foi na região Norte do país, seguida pelas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e a região Sul (BRASIL, 2010a). Na Paraíba, durante esse mesmo período, foram registrados 761 casos de LTA. Em 2009, os cinco municípios Paraibanos com maior número de casos de LTA foram: Alagoa Nova (28), Areia (18), Alagoa Grande (16), Pilões (15) e Alagoinha (6). No ano de 2010, o município de Pilões, apresentou o maior número de casos com 15 notificações, seguido de Alagoa Nova (11), Matinhas (7), Areia (6) e Alagoa Grande (5) (BRASIL, 2010b). Contudo, é possível que o número real seja bem superior, devido a uma provável subnotificação dos casos (BRASIL, 2006, 2010a).

No Brasil, embora os pacientes com LTA muitas vezes sejam diagnosticados e iniciam tratamentos nas unidades básicas de saúde de seus municípios, na maioria das vezes acabam sendo enviados para os hospitais de referência dos seus estados, pois quase sempre há necessidade de testes mais específicos para a confirmação da doença além de outros tratamentos adjacentes e comumente falta profissionais treinados nesses postos de saúde (REITHINGER et al., 2007; BRASIL, 2010). No estado da Paraíba isso também acontece e os hospitais de referência para o tratamento da LTA são: o Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da UFPB em João Pessoa, e o Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) da UFCG, em Campina Grande.

Em João Pessoa o nosso laboratório de pesquisa “Biologia de *Leishmania* sp”. do Departamento de Biologia Molecular da UFPB, vem já durante alguns anos auxiliando no diagnóstico parasitológico de leishmaniose tegumentar e visceral de pacientes atendidos no

HULW da mesma instituição, provenientes tanto da capital do estado como de outras cidades e municípios adjacentes.

No Brasil, a maioria dos casos de LTA é caracterizada como LCL, enquanto as outras manifestações clínicas tegumentares são menos frequentes. A LCDS representa até 2% dos casos total de LTA, e a forma LMC compreende de 3 a 5% dos casos. Por outro lado, a LD, forma mais grave de LTA, é a mais rara com pouquíssimos casos descritos na literatura desde sua descoberta (BRASIL, 2010a; SILVEIRA et al., 2008). Dentre os nove casos diagnosticados com LTA no presente estudo, seis (66,7%) apresentaram um quadro clínico de LCL, dois de LCDS (22,22%) e um de LMC (11,11%). Estes achados estão semelhantes aos de outras localidades do país onde a maioria dos casos clínicos apresenta a forma de LCL (BRASIL, 2006; DA SILVA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2010). A LMC ocorre em baixa frequência e, normalmente, é precedida de LCL (SILVEIRA et al., 2004, 2008; NEVES et al., 2005; GOTO, LINDOSO; 2012). O paciente JCNS que apresentou a forma LMC relatou que há cerca de 16 anos sente uma irritação na cavidade nasal, embora nunca tenha procurado auxílio médico para uma avaliação. Além disso, este paciente possui uma cicatriz típica de LCL, que relata ter contraído nesse mesmo período, contudo, esta lesão apresentou cura clínica espontânea sem que fizesse um diagnóstico apropriado.

A confirmação do diagnóstico e a identificação da espécie de *Leishmania* sp., tem extrema importância tanto pelas razões clínicas dos pacientes acometidos, como por razões epidemiológicas da região endêmica envolvida (BELLI, 1998; GOTO; LINDOSO, 2012). Contudo em diversas regiões do Brasil, o diagnóstico é muitas vezes baseado somente na apresentação clínica das lesões e quando possível associado ao teste intradérmico (Reação de Montenegro), que quando positivo, não exclui outras infecções (BRASIL, 2010a). No diagnóstico parasitológico é realizado uma pesquisa do parasito em material de biópsia de lesão. O material obtido pode ser utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas que são coradas e observadas sob microscopia óptica a para a pesquisa das formas amastigotas do parasita. Alternativamente fragmentos da lesão são inoculados em meios de cultivo apropriados para posterior pesquisa das formas promastigotas de *Leishmania* sp. (GONTIJO; MELO, 2004, VEGA-LÓPEZ, 2003; DA SILVA et al., 2006; KILIC et al., 2008).

Dos treze pacientes inclusos no estudo, foram obtidos nove isolados, devido à perda de material, por contaminação e limitações no crescimento. Em outros estudos também já relataram que uma das desvantagens desse método é a possibilidade da cultura ser

contaminada por outros microrganismos (CUBA et al., 1986 apud ROMERO et al., 2001; ASHFORD et al., 1995; GONTIJO; MELO, 2004).

Dentre os novos isolados utilizados no estudo, apenas um pertence ao paciente residente na capital do estado, João Pessoa, e os restantes isolados (oito) correspondem a pacientes residentes no município de Pilões (estado da Paraíba) representando 88,88% do total dos isolados. O município de Pilões fica numa área rural a 106 km da capital, João Pessoa. De acordo com os questionários aplicados e em visitas a área (Figura 13) pôde-se verificar que o município tem caráter rural e todos os pacientes dessa região são de baixa renda, trabalham principalmente no campo e vivem em sítios e localidades com vegetação próxima constituída principalmente de bananeiras, mangueiras, milharal e fauna de reservatórios de animais domésticos (cães, pacas, gatos e cavalos). Esses locais possuem condições favoráveis para a manutenção do ciclo do parasito, como já discutido por outros autores em regiões com características semelhantes a desse Município (GONTIJO; MELO, 2004; DA SILVA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2010). Além disto, desses pacientes, 77% foram do sexo masculino. Esses dados vão de acordo com relatos da literatura onde normalmente esses indivíduos estão ligados a atividades rurais onde ficam mais expostos à infecção pelos flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004; DA SILVA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2010; MURBACK et al., 2011).

A utilização de técnicas moleculares para o estudo dos agentes etiológicos da LTA pode auxiliar na compreensão das diferentes formas clínicas apresentadas em humanos pela infecção por *L. (V.) braziliensis* (CUPOLILLO et al., 2003; ROCHETTE et al., 2008; BRASIL, 2010a; WHO, 2010). Adicionalmente, a caracterização molecular é fundamental para determinar as relações genéticas entre os parasitos e pode ser uma ferramenta valiosa para determinação de alvos moleculares potenciais e desenvolvimento de novos fármacos (CROFT et al., 2006).

No presente estudo foram analisados nove isolados de *Leishmania* sp. oriundos de pacientes com LTA atendidos no HULW/UFPB do estado da Paraíba. Foram empregadas diferentes técnicas moleculares: PCR específica da região do kDNA para a identificação dos parasitos, RAPD-PCR, SSR-PCR e RFLP-PCR para alvos de ITS₁ e *hsp70* para o estudo de diversidade genética. A escolha dessas técnicas baseou-se em dados da literatura que mostraram aplicabilidade das mesmas aos nossos objetivos de identificação e caracterização molecular dos isolados (CUPOLILLO et al., 1995, 1998, 2003; DEGRAVE et al., 1994;

SHAW et al., 2005; MAFURT et al., 2003; BAÑULS et al., 2007, KUHLS et al., 2005; VAEZNIA et al., 2009, BUITRAGO et al., 2011).

Através da técnica de PCR específica da região do kDNA (DEGRAVE et al., 1994), foi observado que todos os isolados foram caracterizados como pertencentes ao complexo *L. braziliensis* do subgênero *Viannia*, porque todas as amostras amplificaram um fragmento de 750pb com os iniciadores B1/B2, específicos para esse complexo (BRUJIN; BARKER, 1992). Utilizou-se também os iniciadores M1/M2 (ERESH et al., 1994), específicos para o complexo *L. (L.) mexicana*, onde nenhum isolado amplificou com estes iniciadores, confirmando a identificação feita anteriormente. Esses iniciadores foram utilizados porque a *L. (L.) amazonensis* do complexo *L. (L.) mexicana*, pertence ao grupo de parasitos que também causam a LTA no Brasil (SILVEIRA et al., 2004).

Das sete espécies reportadas como agente etiológico da LTA no Brasil, seis são do subgênero *Viannia*. São elas a *L. (V.) braziliensis* (V), *L. guyanensis* (V), *L. naifi* (V), *L. lansonii* (V) *L. shawi* (V) e *L. lindenbergi* (V) (LAISON; SHAW, 1987; SILVEIRA et al., 2010). Contudo, nos estados já investigados, *L. braziliensis* é a espécie prevalente parasitando o homem no país, assim como nos demais países da América Latina (LUIS et al., 2011; VERGEL et al., 2005, VOLPINI et al., 2004, ANDRADE et al., 2006; MARTINS, ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010; BRANDÃO-FILHO et al., 2003, BRITO et al., 1993, 2009; CUPOLLILO et al., 2003, RODRIGUES et al., 2002).

Até o momento, não há relatos de estudos sobre os parasitos *Leishmania* sp. associados a LTA no estado da Paraíba. Os resultados do presente trabalho mostraram que todos os isolados obtidos pertencem ao complexo *L. (V.) braziliensis*. Parasitos da espécie *L. peruviana*, pertencente ao mesmo complexo que a *L. (V.) braziliensis* é uma espécie que está associada a casos de LTA apenas em vales muito elevados e secos das vertentes ocidentais dos Andes, na Bolívia, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela, sem casos reportados no Brasil (PEREZ et al., 2007; BRASIL, 2010a). Portanto pode-se concluir que todos os isolados do complexo *L. (V.) braziliensis* do presente estudo, pertencem a espécie *L. (V.) braziliensis*. Estes resultados são semelhantes a outros relatados na literatura, em que foi identificado que a espécie *L. (V.) braziliensis* é o principal agente etiológico da LTA no Brasil (BRANDÃO-FILHO et al., 2003, BRITO et al., 1993, 2009; CUPOLLILO et al., 2003, RODRIGUES et al., 2002).

Uma vez esclarecida a identidade dos isolados de *Leishmania* sp. em estudo, estudos moleculares foram realizados a fim de investigar possíveis polimorfismos entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes do estado da Paraíba/BR.

Uma das técnicas utilizadas para investigar um possível polimorfismo entre os isolados em estudo foi a técnica de RAPD-PCR. Nessa técnica o número de loci que podem ser examinados é ilimitado e apresenta alto poder de discriminação para a caracterização e detecção de polimorfismo genético de microrganismos. Ela vem sendo utilizada como ferramenta para a taxonomia, filogenia e estudos epidemiológicos das leishmanioses (GOMES, et al., 1995, ISHIKAWA et al., 2002, BAÑULS et al. 2002, 2007, MARTINEZ, et al., 2003; SCHRIEFER, et al., 2004).

Todos os iniciadores utilizados para RAPD-PCR (P53, P14, L15 (996) e M13F-40), foram capazes de agrupar os isolados, de forma geral, num único grupo juntamente com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*), confirmando a identidade destes isolados. Adicionalmente foi possível identificar um significativo polimorfismo existente entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* de ambas as regiões (Município de Pilões e da cidade de João Pessoa). A literatura trás estudos que mostraram a variabilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* oriundos de diferentes formas clínicas de LTA tanto da mesma região geográfica, como de regiões distintas (GOMES et al., 1995; ISHIKAWA et al., 2002; SCHRIEFER et al., 2004). O estudo dos padrões de bandas gerados na técnica de RAPD com os quatro iniciadores utilizados permitiu a construção de um fenograma consenso com dois principais *clusters*, os isolados agrupados juntamente com a cepa padrão e as outras espécies do subgênero *Viannia* juntas. Além disso, o suporte dado pelo *Bootstrap* foi muito significativo demonstrando que os isolados de *L. brasiliensis* por compartilharem mais caracteres com a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*), confirmando sua identidade. Contudo apesar de se terem posicionado próximas a cepa padrão, os isolados apresentaram comportamentos diferenciados o que refletiu em 62,63% de similaridade entre os isolados revelando 37, 37% de variabilidade genética entre eles.

Já foi descrito na literatura que os iniciadores utilizados no presente trabalho foram capazes de evidenciar diversidade genética interespecífica de *L. (V.) braziliensis*, de uma mesma região geográfica, como demonstrado por Ishikawa et al., (2002), estudando os isolados de *L. (V.) braziliensis* das regiões do Pará e do Paraná. Do mesmo modo Gomes e colaboradores, (1995), demonstraram que isolados *L. (V.) braziliensis* do Pará se mostram bastante variáveis entre si, quando comparados com os de Minas Gerais que foram mais

homogêneas. Estudos realizados por Carvalho e colaboradores (2006), com isolados de *L. braziliensis* de Mato Grosso do Sul, observaram uma variabilidade entre esses isolados, que por sua vez foram mais diferentes dos isolados de *L. (V.) braziliensis* de Minas Gerais que se apresentaram menos polimórficos. Schriefer e colaboradores, (2004) estudou isolados de *L. braziliensis* com diferentes formas clínicas de LTA, oriundos de uma mesma região do nordeste, e viram que esses se agruparam em grupos diferentes, demonstrando alta variabilidade entre os mesmos.

Outras espécies do subgênero *Viannia* como a *L. (V.) naiffi* e a *L. (V.) guyanensis* são retratadas como muito próximas de *L. (V.) braziliensis* e muitas vezes em análises moleculares iniciadores específicos para o subgênero não conseguem separar os mesmos (ROTUREAU et al., 2006; SILVEIRA et al., 2004, LAISON; SHAW, 1987). É relatado que essas espécies já foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil (BRASIL, 2006, RAMOS et al., 2005). É possível que essa variabilidade encontrada possa estar associada com a permuta do material genético entre espécies de *Leishmania* (RAVEL et al., 2006; ROUGERON et al., 2010).

No nosso estudo dentre os isolados caracterizados como *L. (V.) braziliensis*, verificou-se que no fenograma consenso os isolados JCTS e JRL (ambas oriundas de LCL) foram agrupados na maioria das reamostragens, gerando árvores suportados por valores de *Bootstrap* de 100%. Observou-se também na análise pelo DNA-POP, que a similaridade entre eles foi maior do que em relação a outros isolados, dados esses comprovados na análise da tabela 1, onde esses isolados apresentaram um maior compartilhamento de bandas, com 64% de índice de similaridade entre eles. Da mesma forma observou-se que os isolados JSL e AF, (ambas oriundas de LCDS), foram as que compartilharam maior porcentagem de bandas. Por outro lado observou-se que o isolado que se manteve mais distante das outras cepas foi o JAS (oriundo de LCL) pois compartilhou menor índice de similaridade com a maioria dos outros isolados. Esses resultados são semelhantes a outros trabalhos realizados com isolados com diferentes formas clínicas, que mostrou que isolados de LCL foram mais similares entre si do que com as de LCDS e por sua vez esses isolados foram também agrupadas mais próximas entre si do que com os provenientes de LCL (SCHRIEFER et al., 2004).

No presente estudo foi possível observar que existe um equivalente polimorfismo entre os isolados obtidos de pacientes de Pilões, e entre estes e o isolado obtido do paciente de João Pessoa. Esta diversidade genética de *L. (V.) braziliensis*, também evidenciada em outros estudos pode ser devido a mutações gênicas e cromossômicas. A maioria dos estudos

reforçam que este parasito é um organismo basicamente assexual, que continuamente sofre mutações naturais o qual não somente gera novos alelos, mas cria novas combinações alélicas dentro da população, gerando um profundo efeito na diversidade genética (ROUGERON et al., 2009). Contudo esta diversidade pode ser também fruto de troca de material genético devido a uma possível reprodução sexual em *Leishmania* sp (ROUGERON et al 2010).

A técnica SSR-PCR com o iniciador K7, também foi capaz de demonstrar variabilidade intra-específica entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* e a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*). Foram observados que de forma geral os isolados se agruparam em um único *cluster* com a cepa de referência M2903 (*L. (V.) braziliensis*) separando os isolados das outras amostras de referência utilizadas. Apesar desse isolados de *L. braziliensis* apresentarem 84% de similaridade, os 16% de bandas não compartilhadas indica polimorfismo entre as mesmas. Diversos trabalhos vêm demonstrando grande polimorfismo e heterogeneidade dentro desse grupo de parasitos com emprego desse iniciador na técnica SSR-PCR (KHULS et al., 2005, 2007; CUERVO et al., 2007). Observou-se no fenograma gerado que apenas o isolado JAS (oriundo de LCL) não se agrupou com a cepa de referência M2903, nem como os outros isolados, mas com a cepa M5956 (*L. (V.) shawi*) também do subgênero *Viannia* da mesma forma que com a técnica RAPD. Já o fenograma consenso gerado com as técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR, houve o agrupamento de todas as amostras de forma semelhante ao consenso da RAPD-PCR, sendo que os isolados se agruparam no mesmo *cluster* que a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*) com os isolados AF e JSL (oriundos de LCDS) se agrupando mais próximas uma da outra, bem como os isolados JCTS e JRL (oriundos de LCL), sendo que todas provenientes do município de Pilões. Contudo podem ser ainda observados diferenças na distância genética entre esses isolados. Conclui-se desse resultado que embora todos os isolados tenham sido identificados como *L. (V.) braziliensis*, as duas técnicas juntas reforçam a informação de que essa espécie é significativamente polimórfica. Da mesma forma que estudos desenvolvidos por vários outros autores (CUERVO et al., 2007 KHULS et al., 2007; GOMES et al., 1995; GONTIJO, 2000; CUPOLILO et al., 2003).

A análise da sequência ITS através da técnica de PCR-RFLP foi também utilizada no presente estudo para estudar os isolados de *L. (V.) braziliensis*. Esta técnica tem sido empregada no estudo do polimorfismo intraespecífico da região intergênica ITS₁ do rDNA de *Leishmania* sp. em diversos trabalhos (DOUDI; GHASEMI; SETORKI, 2012, ANDRADE et al., 2006, VOLPINI et al., 2004, BUITRAGO et al., 2011). No presente trabalho, os resultados gerados pelo programa DNA-POP, mostraram uma similaridade de 87% entre os

isolados. Portanto mostra que 13% de bandas não são compartilhadas entre os isolados, demonstram um polimorfismo entre eles. Pode ser observado cinco perfis para os isolados de *L. (V.) braziliensis* quando o produto da amplificação da sequência ITS₁ foi digerido com a enzima HaeIII. Observou-se que os isolados MRSS, JMTS, JCTS, JRL (todos oriundos de LCL), e AF (oriundo de LCD), apresentaram o mesmo perfil de bandas e os isolados JSL (oriundo de LCD), JCNS (oriundo de LMC), MFTS e JAS (oriundos de LCL) tiveram perfis de bandas distintos. Os isolados agruparam-se todos num mesmo *cluster* juntamente com a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*) enquanto as outras cepas de referência do subgênero *Viannia* também ficaram muito próximas deste cluster. Porém os isolados apresentaram agrupamentos e distâncias genéticas entre eles diferentes. No entanto observa-se que novamente o isolado JAS (oriundo de LCL) manteve-se mais afastado com uma distância maior do grupo formado pelos isolados. Esses perfis encontrados são indicativos de que a região espaçadora intergênica ITS₁ dos isolados estudados foi capaz de demonstrar variabilidade entre eles já caracterizados como sendo do subgênero *Viannia*. Resultados similares já haviam sido descritos por Cupolillo e colaboradores, (1995) onde verificaram um significativo polimorfismo entre diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* analisando esta região gênica. A mesma autora e seus colaboradores em 2003 fizeram estudos semelhantes com isolados de diferentes regiões do Brasil, onde ficou demonstrado que existe polimorfismo entre os mesmos.

A técnica de PCR-RFLP também foi utilizada no nosso trabalho analisando a amplificação da região do gene *hsp70*. Muitos estudos vêm demonstrando a funcionalidade dessa região como propícia para estudos de polimorfismo genético entre espécies de *Leishmania* (ARORA; KAPOOR; SEHGAL, 1998; GARCIA et al., 2007; SILVA et al., 2010; ALVAREZ et al., 2010). Foram obtidos cinco perfis de restrição entre os isolados de *L. (V.) braziliensis* nesta análise. Os isolados JSL (LCD), AF (LCD), JCTS (LCL), JRL (LCL), MFTS (LCL) apresentaram o mesmo perfil de bandas e as amostras, MRSS (LCL), JMTS (LCL), JCNS (LMC), e JAS (LCL), tiveram perfis de bandas distintos. Com as análises realizadas no programa DNA POP, observou-se que fenograma gerado pela análise do perfil de restrição da região do gene *hsp70*, com a enzima BstUI, mostra mais uma vez que os isolados se agruparam de forma geral muito próximos entre si e a cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*) incluindo o isolado JAS (LCL) (proveniente de uma recidiva e falha ao tratamento com as duas drogas de referência para o tratamento das leishmanioses) que sempre tem se mantido afastado da cepa M2903 (*L. (V.) braziliensis*) nas análises das outras regiões.

Do mesmo modo que Silva e colaboradores, (2010) fizeram ao identificarem diferentes espécies como *L. (V.) braziliensis* em isolados de diferentes regiões do Brasil, além de demonstrarem polimorfismo entre as mesmas.

Embora a reprodução sexual em *Leishmania* sp. já tenha sido identificada (BANULS et al., 2007; RAVEL et al., 2006; ROUGERON et al., 2010), o conceito ainda mais aceito é de que a variabilidade genética em *Leishmania* sp. depende essencialmente da ocorrência de mutações recorrentes (LAINSON, SHAW, 1987). Dessa forma nossos resultados sugerem que os métodos moleculares utilizados no nosso estudo foram capazes de detectar diferenças que podem estar relacionadas a mutações, deleções, inserções ou adaptações que refletem a distância genética evolutiva entre as cepas. A diversidade genética observada no presente estudo, analisando o isolado oriundo de um caso de João Pessoa e os isolados de Pilões, não demonstrou uma correlação entre a origem geográfica dos isolados, sinalizando algo semelhante ao observado por Cupolillo e colaboradores (2001), onde populações mais próximas geograficamente necessariamente não apresentam uma maior similaridade genética em isolados da espécie *L. (V.) braziliensis* do que populações mais distantes geograficamente.

Uma vez conhecida a identidade dos isolados em estudo, como pertencentes a espécie *L. (V.) braziliensis*, assim como investigado e demonstrado um significativo polimorfismo genético entre eles, através da análise molecular de diversas regiões gênicas, objetivou-se também conhecer fenotipicamente o comportamento dos mesmos através de estudos sobre o perfil de crescimento em meio de cultivo e a sensibilidade a drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses.

Sabe-se que a cinética de crescimento de parasitos *Leishmania* sp. em meio de cultura pode acrescentar informações a respeito destes parasitas (STANKOV et al., 2010). O crescimento das formas promastigotas em meio de cultivo se assemelha ao crescimento dos parasitos no interior do seu inseto vetor (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). Em meio de cultura comumente os parasitos apresentam uma fase logarítmica de crescimento seguida de uma fase estacionária, quando então os parasitos se desenvolvem em formas promastigotas mais virulentas (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

As formas promastigotas dos diferentes isolados foram cultivadas em meio NNN/Schnneider, utilizando um inóculo proveniente de uma cultura de três dias de cultivo a 25°C. Observou-se a partir do 4º dia de cultivo, um crescimento significativamente diferenciado de todas as culturas, tanto em relação a cepa de referência M2903, como entre os próprios isolados provenientes de todas as formas clínicas. Dentre os isolados de *L. (V.)*

braziliensis, pode-se observar no sexto dia de cultivo, a seguinte ordem decrescente de crescimento: AF, JCNS, JMTS, JSL, JCTS, MFTS, MRSS, JAS e JRL. Portanto, foi verificado que esses parasitos, todos pertencentes a espécie de *L. (V.) braziliensis*, possuem uma heterogeneidade com relação a esta característica fenotípica, com variações no tempo de alcance da fase estacionária de crescimento, bem como no número de parasitos obtidos em cultura.

No combate a LTA a eficácia dos diferentes tratamentos é consequência de um conjunto de fatores que variam desde o perfil genético e imunológico do paciente a diferenças intrínsecas de cada espécie de *Leishmania* sp (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). São diversas as alterações que podem estar relacionadas a susceptibilidade dos parasitos às drogas, como modificações na permeabilidade celular, modificações na sensibilidade do alvo da droga, dentre outros. Essas modificações nas populações podem ter origens múltiplas como: adaptação fisiológica; seleção diferencial de indivíduos residentes numa população mista; mutações aleatórias seguidas de seleção e alterações na expressão gênica (SINGH et al., 2006).

Estudos já demonstraram que diferentes formas clínicas da leishmaniose podem apresentar respostas diferenciadas ao tratamento frente aos antimoniais utilizados na terapêutica dessa parasitose (YARDLEY et al., 2005; AREVALO et al., 2007; HALDAR; SEM; ROY; 2011;). É pouco compreendida as razões destas diferenças quanto a resposta à terapêutica, mas a resistência dos parasitos a droga em uso, pode ser um dos fatores (CROFT; COMBS, 2003; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; CUPOLILO et al., 2003).

Na análise de sensibilidade a drogas do presente estudo, verificou-se que os isolados de *L. (V.) braziliensis* apresentaram diferenças em relação as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. A atividade antipromastigota do Antimônio nas suas formas pentavalente (Sb^V) e trivalente (Sb^{III}) e a Anfotericina B foram testadas para os diversos isolados e para a cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* (M2903).

Em relação ao Antimônio pentavalente (Sb^V) observou-se que todos os isolados apresentaram-se sensíveis a esta droga, apresentando valores de IC_{50} semelhantes. Diversos estudos já investigaram a sensibilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* frente ao antimônio pentavalente (ROMERO et al., 2001; AZEREDO-COUTINHO et al., 2007; LUZ, VERMEERSCH; DUJARDIN, 2009; ZAULI - NASCIMENTO et al., 2010).

É relatado na literatura que as formas promastigotas de *Leishmania* sp. são pouco sensíveis ao antimônio pentavalente. Quanto a sua atuação, estudos já demonstraram que o

antimônio pentavalente é uma pró-droga, sendo convertido ao antimônio trivalente após sua administração (RATH et al., 2003; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Portanto, a antimônio trivalente (Sb^{III}), que apresenta uma toxicidade muito superior quando comparado a forma pentavalente, seria o principal agente leishmanicida na terapêutica com os antimoniais pentavalentes (CROFT; COMBS, 2003; HALDAR; SEM; ROY; 2011). No presente estudo, observou-se que todos os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram sensíveis ao antimônio trivalente, apresentando inibição de crescimento significativa em todas as concentrações testadas. Em relação aos IC_{50} gerados, a análise de sensibilidade entre os isolados demonstrou que o isolado JCTS (oriundo de LCL) foi mais sensível do que os isolados de JSL (oriundo LCDS) e JRL (oriundo LCL). Vale ressaltar que o isolado JSL é proveniente de um paciente que, após tratamento com o Antimônio pentavalente, teve recidiva cerca de um ano após administração dessa droga. O isolado JAS (oriundo de LCL), obtido de um paciente que teve falhas no tratamento com essa droga e foi proveniente de um quadro de recidiva apresentou reação ao Antimônio pentavalente, se mostrou igualmente sensível quando comparadas com os outros isolados. Estudos realizados por Azevedo-Coutinho e colaboradores (2007) já demonstraram que isolados menos sensíveis aos Antimônios foram aqueles que apresentaram falhas terapêuticas ou recidivas da doença. No presente trabalho não observou-se resultados semelhantes para o Antimônio pentavalente, pois os isolados JAS e JSL, (oriundos de LCL e LCDS, respectivamente com quadro de recidiva) foram igualmente sensíveis em relação aos outros isolados para o Antimônio pentavalente. Porém na análise da sensibilidade com a forma trivalente do Antimônio, o isolado JSL (oriundo de LCDS) apresentou um dos maiores valores de IC_{50} sendo mais resistente do que o isolado JCTS podendo justificar esse quadro de recidiva após um ano de tratamento.

Foi observado que todos pacientes avaliados nesse trabalho, apresentaram melhora clínica após tratamento (Quadro20). Apesar de ser relatado que, dentre as formas tegumentares das LTA associadas a *L. (V.) braziliensis*, pacientes com a forma mucocutânea apresentam um percentual de falha no tratamento variando entre 10 e 70% (GOTO; LINDOSO, 2010), observou-se que no presente trabalho, o único paciente com LMC respondeu bem ao tratamento e teve evolução para a cura clínica.

A sensibilidade dos isolados de *L. (V.) braziliensis* foi também avaliada com a droga Anfotericina B, que é a segunda escolha no tratamento das leishmanioses no Brasil (BRASIL, 2010, MALTEZOU, 2010, RATH et al., 2003). Estudo tem mostrado que a avaliação da atividade da Anfotericina B para formas promastigotas é similar ao resultado encontrado em

experimentos com formas amastigotas de *Leishmania* sp. (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010; AREVALO et al., 2007)

Observou-se no presente estudo que todos os isolados foram sensíveis a essa droga, assim como outros isolados de *Leishmania* sp. já investigados quanto à sensibilidade à Anfotericina B (SHARIEF et al., 2006; ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). Ao serem analisados os valores de IC₅₀ para esta droga, observou-se que, dentre todos os isolados, JAS e JRL (ambos oriundos de LCL) foram os mais sensíveis em relação a todos os outros isolados. Além disso o isolado AF (oriundo de LCDS) e o MRSS demonstraram maior sensibilidade de que o isolados MFTS (oriundo de LCL).

O uso de medicamentos alternativos como a Anfotericina B é indicado como droga de 2º escolha para os casos de resistência ou impossibilidade de uso do antimônio pentavalente (BRASIL, 2010, RATH et al., 2003). Contudo, o seu uso também apresenta limitações por apresentar efeitos colaterais frequentes e graves (RATH et al., 2003). Neste estudo apenas um paciente o JAS (oriundo de LCL) se tratou com essa droga, pois apresentou intolerância ao tratamento com o Antimônio pentavalente. O isolado desse paciente (como anteriormente mencionado) foi proveniente de um ciclo de tratamento falho com as duas principais drogas de referência (Antimônio pentavalente e Anfotericina B). Este apresentou melhora clínica somente após ser tratado com Fluconozol e Alopurinol. Porém ainda assim teve uma recidiva após esses seis meses de tratamento. A combinação entre o antimonial e Alopurinol, ou o uso deste com o antifúngico fluconozol tem sido proposta como alternativa para melhora da eficácia terapêutica destes compostos, bem como nova metodologia de tratamento (BRASIL, 2010a). Por outro lado esse isolado foi um dos que apresentaram menores valores de IC₅₀ quando testadas frente à Anfotericina B. Contudo, o paciente do qual foi obtido esse isolado foi tratado com essa droga (Anfotericina B) e apresentou forte reação, de forma que o tratamento foi interrompido. Diversos estudos já mostraram que essa droga é muito mais tóxica sobre as formas promastigotas de *Leishmania* do que os Antimoniais pentavalentes (CROFT; YARLEY 2002, RATH et al., 2003).

Até então nenhum estudo havia sido realizado para identificar as espécies de *Leishmania* sp., presentes no estado da Paraíba associadas às formas de LTA, assim como inferir sobre a existência de polimorfismo entre estes parasitos ou quaisquer outros estudos moleculares em casos de LTA. Desse modo nosso trabalho é pioneiro nesse campo e embora com um número pequeno de amostras, foi capaz de identificar que todos os isolados estudados, oriundos de diferentes formas de LTA, são *L. (V.) braziliensis* e que estes possuem

um alto grau de polimorfismo, mesmos sendo obtidos de uma mesma localidade geográfica do estado. Estes achados reforçam outros já descritos na literatura, mostrando um significativo polimorfismo em isolados da espécie *L. (V.) braziliensis* obtidos em outras regiões do Brasil e outros países da América latina (GOMES et al., 1995; CUPOLILLO et al., 2003).

6 CONCLUSÃO

6 Conclusão

Podemos concluir que os nove isolados obtidos de pacientes provenientes do HULW, com diferentes formas clínicas de LTA, foram identificados como sendo da espécie *L. (V.) braziliensis*. No entanto, através de técnicas de caracterização molecular, estes isolados se mostraram bastantes polimórficos geneticamente, revelando um alto nível de variação intraespecífica. Adicionalmente foram também observados fenótipos diferentes entre estes isolados, visto que foram identificadas variações quantitativas no crescimento das formas promastigotas em meio de cultura, além de diferenças quanto à sensibilidade as drogas anfotericina B e antimônio trivalente, entre alguns isolados de *L. (V.) braziliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencia bibliográfica

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D.G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. v. 112, n.18, p. 2993-3002, 1999.

ALBUQUERQUE A. C. L., PEREIRA, J. V., OLIVEIRA, J. F. D., CARVALHO, SARMENTO, V. A., ARAÚJO C. R. F., SILVA, D. F. Estudo da prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana com repercussão na cavidade bucal no município de Alagoa Grande (PB). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 9, n. 2, p. 108-112, 2010

ALVAR, J. VELEZ, I. D., BERN, C., ´ HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., BOER, M. D., THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM". LEISHMANIASIS WORLDWIDE AND GLOBAL ESTIMATES OF ITS INCIDENCE. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**. v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.

ANDRADE, B. B.; de OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. ; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 66, n. 2-3, p. 122–127, 2007.

ANDRADE, H.M., REIS, A.B., SANTOS, S.L., VOLPINI, A.C., MARQUES, M.J., ROMANHA, A.J. Use of PCR–RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 140, n 3–4, P. 231–238, 2006.

AREVALO J, RAMIREZ L, ADAUI V, et al. Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Infection Diseases**; v. 195, n. 18, p. 46–51. 2007

ASHFORD, D.A., BOZZA, M., FREIRE, M., MIRANDA, J.C., SHERLOCK, I., EULALIO, C., LOPES, U., FERNANDES, O., DEGRAVE, W., BARKER JR., R.H., BADARÓ, R., DAVID, J.R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 53 p. 251-255. 1995.

ASHUTOSH, SUNDAR S. GOYAL N. Molecular mechanisms of antimony resistance in leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 43-153, 2007.

ASTELBAUER F, WALOCHNIK J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 38, n. 2, p. 118-124, 2011.

AZEREDO-COUTINHO RB, MENDONÇA SC, CALLAHAN H, PORTAL AC, MAX G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 688-693. 2007.

ARORA, S. K., KAPOOR, G. S., SEHGAL, S. Heterogeneity in heat shock pretein genes in *Leishmania* isolates. **Immunology and Cell Biology**. v.76, p. 186-189, 1998.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*. v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.
BOGLIOLO, L. **Patologia geral básica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BAÑULS, A. J., HIDE, M., TIBAYRENC, M. X. Evolutionary GENETICS AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Leishmania* species. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 96, p. 9-13, 2002.

BANULS AL, HIDE M, PRUGNOLLE F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**. V. 64 p.1–109, 2007

BARRAL, A., GUERREIRO, J., BOMFIM, G., CORREIA, D., BARRAL-NETTO, M., CARVALHO, E. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 53, 256–259, 1995.

BASTIEN, P., BLANEAU, C., PAGÈS, M. *Leishmania*: sex, lies and karyotypes. **Parasitology Today**. V. 8, p:174-177, 1992.

BEATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**. V. 37, P. 1097–1106, 2007.

BELLI, A., RODRIGUEZ B, AVILES H, HARRIS E. AM. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v 58 n 1. P 102-109,1998.

BRANDÃO-FILHO, S. P., BRITO, C., ISHIKAWA, E. A., CUPOLILLO, E., FLOETERWINTER, L, SHAW, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; 97, 291-296, 2003.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar 1a ed., 3a reimpressão.** Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2a ed., 180p. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Brasília, DF, 2010.

BRASIL, SINAN/SVS/MS. Boletim eletrônico epidemiológico, abril, 2010. SINAN/SVSMS (2010). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_lta_casos_27_10_2010.pdf>. Acesso em 22/09/2011.

BUITRAGO, R. CUPOLLO, E., BASTENTS, B., LÊ PONT, F., MARTINEZ, E., BARNABÉ, C., BRENIERE, S.F. PCR- RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. **Infection, Genetics and Evolution.** V. 11, n.3. p 557-563, 2011.

BRITO, M. E. F., ANDRADE, M. S., MENDONÇA, M. G., SILVA, C. J., ALMEIDA EL, LIMA BS, FÉLIX, SM, ABATH FGC, DA GRAÇA GC, PORROZZI R, ISHIKAWA, E.A., SHAW, J. J., CUPOLILLO, E., BRANDÃO-FILHO, S.P. Species diversity of *Leishmania* (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**; 14: 1278–1286, 2009.

BULLE, B., MILLON, L., BART, J., GÁLLEGO, M., GAMBARELLI, F., PORTÚS, M., SCHNUR, L., JAFFE, C.L., FERNANDEZ-BARREDO, S., ALUNDA, J.M., PIARROUX, R., Practical Approach for Typing strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3391-3397. 2002.

CASTRO, E. A., TELLES, F. Q., PANDEY, A., BISETO, A, DINAIKI, M, SALGUEIRO, I., THOMAZ SOCCOL, V. Eco-epidemiological survey of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Vlle River, Paraná state, Brazil. **Acta Tropica.** v. 93, p. 141-149, 2005.

CAMARGO,E.P. Doenças Tropicais. **Estudos avançados.** V. 22, p. 64:95- 110, 2008.

CARRIÓ, J., DE COLMENARES, M., RIERA, C., GALLEGU, M., ARBOIX, M. & PORTUS, M. *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. **Experimental Parasitology.** V. 95, p. 209–214, 2000.

CARVALHO MLR, de ANDRADE ASR, FONTES CJF, HUEB M, SILVA SO, MELO MN, Leishmania (Viannia) braziliensis is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Tropica**. v. 98, p. 277-285, 2006.

CHAKRAVARTY, J., SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Disease**. v. 2, n. 2, p.167-176. 2010.

CHICHARRO, C, ALVAR, J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. **Annal of Tropical Medical Parasitology**. v. 97, n. 1, p. 75–78, 2003.

CONVIT, J. ULRICH, M. Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Biological Research**. v. 26, n. 1-2, p. 159–166, 1993.

CORTAZAR, T. M., WALKER, J. Genetic manipulation and the study of the protozoan parasite Leishmania. **Biomédica**. v. 24, n.4, p.438-455, 2004.

CORTES, S.; ROLAO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using Leishmania donovani s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 98, n. 1, p.12-7, 2004.

CROFT, S. L., YARDLEY, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

CROFT, S. L., AND G. H. COOMBS. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**. v. 19, p.502–508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUERVO P, CUPOLILLO E, NEHME N, HERNANDEZ V, SARAIVA N & FERNANDES O Leishmania (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. **Experimental Parasitology**. v. 108, p. 59-66, 2007.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental Molecular Pathology**. v. 72, n. 2, p. 132-41. 2002

CUPOLILLO, E., GRIMALDI, G., MOMEN, H., BEVERLEY, S. Intergenic region typing (ITR): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 73, p: 145–155, 1995.

CUPOLILLO E, MOMEM H, GRIMALDI Jr G. Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93. n. 5, P. 663-668, 1998.

CUPOLILLO, E., BRAHIM, L.R., TOALDO, C.B., DE OLIVEIRA-NETO, M.P., DE BRITO, M.E., FALQUETO, A., DE FARIAS NAIFF, M., GRIMALDI JR., G.,. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 3126–3132, 2003.

DAVID, C. V. CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*. v. 22. 491-502. 2009.

DEMICHELI C, FRÉZARD F. Novas embalagens para medicamentos a base de antimônio para Leishmanioses e para Esquistossomose. **Cadernos temáticos de química da nova escolano**. n.5, 2005.

DE BRUIJIN MHL, BARKER DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta tropica**. v.52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DEGRAVE, W. O.F., CAMPBELL, D., BOZZA, B., LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- a mini Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v.89, n. 3, p: 463-469, 1994.

DESJEUX, P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.27, p. 305, 2004.

DIRIENZO, J. M.; CORNELL, S.; BOEHRINGER, H. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. **Oral Microbiology Immunology**. v. 6, p. 88-96, 1991

DOUDI, M., GHASEMI, F., SETORKI, MAHBUBEH. Genetic polymorphism analysis of *Leishmania tropica* isolated from three endemic regions (Bam, Kermanshah and Mashhad) in Iran by PCR-RFLP technique and based on ITS1 sequences. *African Journal of Microbiology Research* v. 6, n. 12, p. 2970-2975, 2012.

DO VALE, E. C. S., FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem , expansão e etiologia. *Annais Brasileiros de Dermatologia*. v. 80, n. 4. 421-8, 2005.

DUJARDIN, J. C.; BAÑULS, A. L. ; LLANOS-CUENTAS, A.; ALVAREZ, E.; DE DONCKER, S.; JACQUET, D.; LE RAY, D.; AREVALO, J.; TIBAYRENC, M. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*. v. 59, p. 293-307, 1995

ERESH S, M. CALLUM, S. M, BARRER D. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*. v. 109, p. 423-433, 1994

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. v. 39, p: 9. 1985

FERRER, L. Clinical Aspects of canine Leishmaniasis: an update. *Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona*. p. 6-10. 1999.

FERREIRA, C.S.; MARTINS, P.S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLE- TTE, M. e FRÉZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals*, v. 16, p. 441, 2003.

FRAGA J, MONTALVO AM, DE DONCKER S, DUJARDIN JC, VAN DER AUWERA G: Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 10, n. 2, p. 238–245, 2010.

FRESHENEY, R. I. *Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques*. New York. 4 ed., 2000.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C.S. e COSTA, M.A.P. Glutathione- induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. v. 45, p. 913, 2001.

GARCIA AL, KINDT A, QUISPE-TINTAYA KW, BERMUDEZ H, LIANOS A, ARÉVALO J, BAÑULS AL, DE DONCKER S, LE RAY D, DUJARDIN JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infectology Genetics Evolution*. v. 5, p. 109-116, 2005.

GARCIA, A. L, PARRADO, R, DE DONCKER, S, BERMUDEZ, H, DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 101, p.368–371. 2007.

GOMES RF, MACEDO MR, PENA SDJ, MELO MN. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental Parasitology*. v. 80, 681-687, 1995.

GONTIJO, C. M. F. *Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: Estudos moleculares de amostras de Leishmania isoladas de casos humanos 2000*. 140 f. (Tese Doutorado em Parasitologia) - Departamento de Parasitologia, ICB – UFMG Belo Horizonte.

GONTIJO, C. M. F; MELO, M. N. *Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas*. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E. e BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*. v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GOTO H, LINDOSO JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*;8:419–33, 2010.

GOTO, H., LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am* – 2012.

GRIMALDI G JR., TESH RB, MCMAHON-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 41, p. 687-725, 1989.

HALDAR. A. K., SEN, P., ROY S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Molecular Biology International*. p. 23, 2011

HAMAD S. H., MUSA, A. M., KHALIL E. A. G., ABEBE T., YOUNIS, B. M., ELTHAIR, M. E. E., EL-HASSAN, A. M., HAILU, A., Bart, A. *Leishmania*: Probable genetic hybrids between species in Sudanese isolates. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. v. 3 n. 6, p. 142-145, 2011.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*. v. 354, P. 1191-1199, 1999.

HILLIS, D. M.; HUELSENBECK, J. P. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analysis. *Journal of Heredity*. V. 83, p. 189-195, 1992.

HOTEZ, P.J.;MOLYNEUX,D.H.;FENWICK, A.;KUMARESAN, J. EHRLICH SACHS, S. et al. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*. v. 357, p. 1018– 1027, 2007.

HU, N.; MESSING, J. The making of strand-specific M13 probes. *Gene*, v.17, p. 271-277,1982.

ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T.; MAGALHÃES, A. L. P.; GUERRA JR, R. B.; MELO, M. N.; GOMES, R.; SILVEIRA,T. G. V. SHAW, J.J. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 96, p. 2002.

IVENS, A.C., BLACKWELL. J.M., The *Leishmania* Genome Comes of Age. *Parasitology Today*, v. 15, n. 6, 1999.

IVENS, A. C., PEACOCK, C. S., WORTHEY, E. A. MURPHY, L. G., BERRIMAN, M ., SISK, E. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. v. 309 p: 436–442. 2005.

JAMJOOM, M. B., ASHFORD, R. W., BATES, P. A., KEMP, S. J., NOYES, H. A. Polymorphic microsatellite repeats are not conserved between *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. *Molecular Ecology Notes*v. v. 2, p. 104-106, 2002.

KAMHAWI, S. Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*. v.22, n.9, p.439-445, 2006.

KATO, H., GOMEZ, E. A., CÁCERES, A. G., UEZATO, H. MIMORI, T., HASHIGUCHI, Y. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. v. 7, n. 3, p. 814-826, 2010.

KILIÇ, S.; ÖZKAN, A. T.; BABÜR, C.; GÖNÜL, T.; SCHALLIG, H. DEvaluation of serological tests for the diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 38: 13-19. 2008.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*. v.17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KUHLS, K., MAURICIO, I.L., PRATLONG, F., PRESBER, W., SCHONIAN, G.. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection*.v. 7, p. 1224-34, 2005.

KUHLS, K., KEILONAT, L., OCHSENREITHER, S., SCHAAR, M., SCHWEYNOCH, C., PRESBER, W., SCHONIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection* v. 9, p. 334-343, 2007.

LACHAUD, L., DEREURE, J., CHABBERT, E., REYNES, J., MAUBOUSSIN, J., OZIOL, E., DEDET, J. Optimized PCR Using Patient Blood Samples for Diagnosis and Follow-Up of Visceral Leishmaniasis, with Special Reference to AIDS Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 236- 240, 2000.

LAINSON, R., J. J. SHAW. Evolution, classification and geographical distribution, The Leishmaniasis In Biology And Medicine. Academic Press. p. 1–120. 1987.

LANUS, E. C., PINERO, J. E., GONZÁLEZ, A. C., VALLADARES, B., GROSSO, M. L., SALOMÓN, O. D. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. v. 100, n. 2, p. 187-192, 2005.

LIMA, E. B; MOTTA, J. O. C., PORTO, C., SAMPAIO, R. M. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIMA, A. C. V. M. R. Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil”. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais/MG-2010).

LUIS, L., HERRERA, M. I., RAMIRÉZ, R. AGUILAR, C. M., VÉLEZ, I. D., MENDONZA-LEON, A. A PCR assay for the identification of *Leishmania* species of the *Viannia* subgenus. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología*. v. 31, p. 34-70, 2011.

LUZ, R. I., VERMEERSCH, M.,DUJARDIN, J-C., COS, P., MAES, L. In vitro sensitivity Testing of *Leishmania* Clinical Field Isolates: Preconditioning of Promastigotes Enhances Infectivity for Macrophage Host Cells. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. p. 5197-5203, 2009.

MALTEZOU C. H, Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. Review article: Journal of Biomedicine and Biotechnology v.8, 2010.

MARTINS, L., ALEXANDRINO, A., GUIMARÃES, G. Detecção de DNA de Leishmania Braziliensis em Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista Saúde pública. v. 44, n. 3, 2010.

MAURICIO, I. L.; GAUNT M. W.; STOTHARD, JR.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the Leishmania donovani complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitol. v.122, n. 4, p. 393-403, 2001.

MARFUR, J., NIEDERWIESER, I., MAKIA, N.D., BECK, H. P., FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. Diagnostical Microbiology. v. 46, p. 228-232, 2003.

MARTINEZ, E.; ALONSO, V.; QUISPE, A.; THOMAS, M. C.; ALONSO, R.; PIÑERO, J. E.; GONZÁLEZ, A.C.; ORTEGA, A. & VALLADARES, B. RAPD method useful for distinguishing Leishmania species: design of specific primers for L. braziliensis. Parasitology, 127: 513-517, 2003.

MARZOCHI, M. C. A. & MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and possibilities for their control. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro. v. 10 (supl. 2), p. 359-375, 1994.

MOLYNEUX D.H, HOTEZ P.J, FENWICK A. Rapid impact interventions: how a policy of integrated control for Africa neglected tropical diseases could benefit the poor. PloS Medicine. v. 2, p. 11-36 2005.

MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. v. 366, p-1561-77, 2005.

MURBACK N. D. N. Filho G. H., NASCIMENTO R. A. F. NAKAZATO, K. R. O. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

NOLDER D., RONCAL, N., DAVIES, C. R., LLANOS-CUENTAS, A. MILES M. A. Multiple hybrid genotypes of Leishmania (Viannia) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Higiene. v. 76, n. 3, p. 573-578, 2007.

NAVIN TR, ARANA FE, ME'RIDA AM, ARANA BA, CASTILLO L, SILVERS DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v. 42, p. 36–42, 1990.

NIGRO, J. M.; BAKER, S. J.; PREISINGER, A. C.; JESSUP, J. M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S. H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILLE, P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*. v. 342, p. 705-708, 1989.

OCHSENREITHER, S., KUHLS, K., SCHAAR, M., PRESBER, W., SCHONIAN, G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, p. 495-503, 2006.

OLIVEIRA, C. L.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA S. D. An alternative approach to evaluating the intra-specific genetic variability of parasites. *Parasitol Today*, v. 13, p. 196-200, 1997.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, L. C.; AFONSO, L. C. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; SCOTT, P.; MELO, M. N.; and VIEIRA, L. Q. Germfree mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*. V.131, p.477-488, 2005.

OLIVEIRA, J. P. C., FERNANDES, F. CRUZ, A. K., TROMBELA, V., MONTEIRO, E., CAMARGO, A. A., BARRAL, A., OLIVEIRA, C. genetic diversity of *leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease*. Doi: 10.11186/1475'9292.6.5, 2007.

OULELLETE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug resistance update*. v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

PEACOCK, C. S. SEEGER, K., HARRIS, D., MURPHY, RUIZ, J. C., QUAIL, M. A., et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*. v. 39, p. 839 - 847, 2007.

PENA, S. D. J. & NUNES, A. C. DNA – POP and DNA – PATER, two simple computer programs for population studies and paternity analysis with DNA fingerprintings. *Fingerprintings News*, v. 2, p. 7-8, 1990.

PENA, S. D.; BARRETO, G.; VAGO, A. R.; DE MARCO, L.; REINACH, F. C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 91, n. 5, p. 1946-1949, 1994.

PEREZ, J. E, VELAND N, ESPINOSA D, ET AL. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*; 102:655–8. 2007

PRASAD R, KUMAR R, JAISWAL BP, SINGH UK. Mitelfosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian Journal of pediatrics*. v. 71, n. 2, p. 143-144, 2004

QUARESMA, P. F., MURTA, S. M. F., FERREIRA, E., ROCHA-LIMA, A. C. V. M., XAVIER, A. A. P. X., GONTIJO, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA, by real-time PCR. *Acta Tropica*. v. 11, p, 289-294, 2009.

RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., de JESÚS, M. N., MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento das leishmanioses: estado da arte. *Química Nova*. v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAVEL, C., CORTES. S., PRATLONG, F., MORIO, F., DEDET, J. P, CAMPINO, L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*. v. 36, n. 13, p. 383-8, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

ROCHETTE A, RAYMOND F, UBEDA JM, SMITH M, MESSIER N, BOISVERT S, RIGAUULT P, CORBEIL J, OUELLETTE M, PAPADOPOULOU B. Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics*. v. 9, p 255, 2008.

ROCHA, H. K. W. C. GOMES, V. V., FILHO, G. E. G. TAFURI, W. L. T., MEDEIROS, A. C. M. Isolamento e caracterização de parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral em João Pessoa-Paraíba-Brasil. *Revista brasileira de ciências da saúde*. v. 8, n.1, p.15-24, 2004

RODRIGUES, E. H. G., BRITO, M. E. F., MENDONÇA, M. G., WERKHAUSER, R. P., COUTINHO, E. M., SOUZA, W. V., ALBURQUERQUE, M. F. P. M., JARDIM, M., ABATH, F. G. C. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. P. 3572-3576, 2002.

ROJAS, R., L. VALDERRAMA, M. VALDERRAMA, M. X. VARONA, M. OUELLETTE, AND N. G. SARAVIA. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *Journal of Infectology Disease*. v. 193, p. 1375–1383, 2006.

ROMERO GAS, GUERRA MVF, PAES MG, MACEDO VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clinical of Infectious Diseases*. v. 32, p. 1304-1312, 2001.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Britanica Medical Journal*. v.2, p. 1261-1262, 1903.

ROTUREAU B, RAVEL CL, COUPPIÉ P, PRATLONG F, NACHER M, DEDET J P, CARME B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. v. 44, p. 459-467, 2006.

ROUGERON, V., MEEUS, T., KAKO, S. O., HIDE. M, BANULS, A. L. “Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)” in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. *PLoS Pathogens*. v. 6. p. 8. 2010.

ROUGERON V, MEEUS, T. D., HIDE, M, WALECKX, E, BERMUDEZ H, ET AL. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 106, n. 25, p. 10224-10229, 2009.

ROUGERON, V., WALECKX, E., HIDE, M., MEEÛS, T. DE, AREVALO, J. LLANOS-CUENTAS, A., BAÑULSA, A. L. set of 12 microsatellite loci for genetic studies of *Leishmania braziliensi*. *Molecular Ecology Resources*. v. 8, p. 351–353, 2008.

SAKTHIANANDESWAREN, A. FOOTE, S., J, HANDMAN, E. The role of host genetics in Leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. v. 25, n.8, 2009.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SANTOS, F. R., PENA, S. D. J., EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Gene*. v. 90, p. 655-656, 1993.

SCALLIG, H. D. F. H., OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health* v 7, n 8, p. 641-651, 2002.

SCHRIEFER A, SCHRIEFER AL, GOES-NETO A, GUIMARAES LH, CARVALHO LP, ALMEIDA RP, MACHADO PR, LESSA HA, DE JESUS AR, RILEY LW, CARVALHO EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun* 72: 508-514, 2004.

SCHONIAN, G., NASEREDDIN, A., DINSE, N., SCHWEYNOCH, C., SCHALLIG, H., PRESBER, W., JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 47, p. 349-358, 2003.

SCHONIAN, G., AKUFFO, H., LEWIN, S., MAASHO, K., NYLEN, S., PRATLONG, F., EISENBERGER, C., SCHNUR, L., PRESBER, W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous Leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 106, p. 239-248, 2000

SEGATTO, M., RIBEIRO, L. S., COSTA D. L., COSTA, C. H. N., OLIVEIRA M. R., CARVALHO, S. F. G., MACEDO, A. M., VALADARES, H. M. S., DIETZE, R., BRITO, C. F. A., LEMOS, E. M. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. v. 107, n. 1, p. 39-47, 2012.

SHARIEF, A. H., GASIM, K. L. E. A., THEANDER, T. G., KHARAZMI, A., OMER, S. A., IBRAHIM, M. E. *Leishmania donovani*: an in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Experimental Parasitology* 114, 247-252, 2006.

SHAW, J., GRIMALDI, G., CUPOLILLO, E. Identificação de *Leishmania*. In: COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Guanabara Koogan, v. 1, p. 733-737. 2005.

SILVA, E. S., GONTIJO C. M. F., MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol*; v. 21, n. 12, P. 550-552, 2005.

SILVA, L.A.; SOUSA, C. S.; GRAÇA, G.C.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E. Sequence analysis and pCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, genetics and evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics In Infectious Diseases*, v. 10, p. 77-83, 2010.

SILVEIRA F. T, LAINSON R CORBETT, C. E Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. v. 99, p. 239–251, 2004.

SILVEIRA FT, MULLER SR, SOUZA AA, LAINSON RL, GOMES CMC, LAURENTI MD, CORBETT CEP. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Revista Parasitologia Médica*. v. 22, n. 1, p. 9–20. 2008.

SIMÕES-MATTOS, L. Leishmaniose em gatos domésticos: é bom manter-se informado! *Revista Todos os Gatos*. n. 8, p. 22-23, 2005.

SINGH, N., “Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*,” *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 411–422, 2006.

SMITH, D. F., PEACOCK, C. S. AND CRUZ, A. K. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*. v. 37, P. 1173–11, 2007.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. Freeman and Company, San Francisco. Scientific America, 1973.

STANKOV, M., LUCKE T., DAS A. M., SCHMIDT, R. E., BEHRENS, GEORG, M. N. Mitochondrial DNA Depletion and Respiratory Chain Activity in Primary Human Subcutaneous Adipocytes Treated with Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 54, n. 1, p. 280-287, 2010.

TASHAKORI M., KUHLS K., AL-JAWABREH A., MAURICIO I., SCHONIAN G., FARAJNIA, S., ALIMOHAMMADIAN, M. H. *Leishmania major*: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Tropica*. v. 98. p. 52–58, 2006.

THOMAZ-SOCCOL V, LANNOTTE G, RIOUX, J. A, PRATLONG, F, MARTINI-DUMAS, A., SERRES, E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de parasitologie humaine et comparée*. v. 127, n. 4, p. 421- 4, 1993.

TIBAYRENC, M., AYALA, F.J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, v. 18, p. 405-10, 2002.

TODJAL. A. C. S., CUPOLILLO, E., VOLPINI, A. C., ALMEIDA, R, ROMERO, G. A. S. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Tropical Medicine and International Health. Vol. 11 no. 9 pp 1388–1398, 2006.

TUON FF, AMATO VS, GRAF ME, ET AL. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis– a systematic review with a meta-analysis. International Journal of Dermatology. v. 47, p.109–24, 2008.

VAEZNIA, H., DALIMI, A., SADRAEI, J., PIRSTANI, M. Determination of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. Archive of Razi institute.V. 64, N.1, p.39-44, 2009.

VAN EYS, G.J., SCHOONE, G.J., KROON, N.C., EBELING, S.B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. Molecular Biochemical Parasitology. V.51: p.133-142, 1992.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. Current Pharmaceutical Design. v. 8, p. 297-318, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MÜELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. The Journal of Immunology. v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VAN DER PEER, Y.; DER WACHTER, R. Treecon for Windows, a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Computer Application in the Biosciences. v. 10, p. 569-570, 1994.

VEGA-LÓPEZ, F.. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Current Opinion of infectology disease. v. 16, p. 97-101, 2003.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C., ROMANHA, A. PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Tropica. v. 90, p. 31-37, 2004.

WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU, C., PAGES, M., JAUFFRET, DEDET, Y. J-P., BASTIEN. P. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Research. v. 24,n. 9, p: 1688–1694, 1996.

WEIGLE, K.A., SARAIVA, N.G., DE DAVALOS, M., MORENO, L.H., D_ALESSANDRO, A.,. Leishmania braziliensis from the Pacific coast region of Colombia:

foci of transmission, clinical spectrum and isoenzyme phenotypes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 35, p. 722–731, 1986.

WELSH, J. MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research. v. 18, p. 7213-7218,. 1990.

WERBOVETZ, K. A.; BRENDLE, J.J.; SACKETT, D.L. Purification, characterization and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. Molecular Biochemical Parasitology.,v. 98, p. 53-65, 1999.

WHO-2004.WORLD HEALTH ORGANIZATION – Neglected tropical diseases (NTD). Disease.Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/> Acesso em 16 Maio de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Special Program for Research and training in tropical diseases–TDR. Disease information, 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/tdrold/diseases/leish/diseaseinfo.htm>> Acesso em: 20 Junho 2011.

WHO- 2012. WHO Technical Report Series: Control of leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee. Geneva: 949. p. 1–186. Acesso em 12 Abril de 2012.

WU, K. S., JONES, R.; DANNEBERGER, L. SCOLNIK, P. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. Nucleic Acid Res. v. 22, n. 15, p. 3257-3258, 1994.

YANG, B-B., GUO, X-G., HU, S.-S., ZHANG, J. G., LIAO, L., CHEN, D-L., CHEN, P-C. Species discrimination and phylogenetic inference of 17 chinese *Leishmania* isolates based on internal transcribed spacer 1(ITS1) sequences. Vol. 107, pp. 1049-1065. 2010.

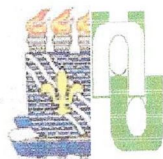
ZAULI-NASCIMENTO1 R. C., MIGUEL1, D. C., YOKOYAMA-YASUNAKA1, J. K. U., PEREIRA, L. I. A., OLIVEIRA, M. A. P., RIBEIRO-DIAS, F., DORTA, M. L., ULIANA, S. R. B. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. v. 15, n. 1 p. 68–76, 2010.

ZERPA O, ULRICH M, BLANCO B, POLEGRE M, AVILA A, MATOS N, MENDOZA I, PRATLONG F, RAVEL C, CONVIT J. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. Britanic Journal of Dermatology. v. 156, p. 1328–1335, 2007.

ZIETKIEWICZ , E.; RAFALSKI, A., LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. v. 20, p. 176-183, 1994.

ZURITA AL, RODRÍGUEZ J,PINERO JE, PACHECO R, CARMELO E, del CASTILLO A, VALLADARES B. Cloning and characterization of the Leishmania (Viannia) braziliensis Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *Journal of Parasitology*. v. 89, n. 2, p. 372-8, 2003.

ANEXO



Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário Lauro Wanderley
Universidade Federal da Paraíba

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES
HUMANOS - CEP**

CERTIDÃO

Com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW, da Universidade Federal da Paraíba, em sua sessão realizada no dia 25/10/2011, após análise do parecer do relator, resolveu considerar **APROVADO** o projeto de pesquisa intitulado **CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Leishmania sp.* ISOLADOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.** Protocolo CEP/HULW nº. 468/11, Folha de Rosto nº 470319, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE Nº 0244.0.126.000-11, das pesquisadoras Yara Katia Santos Rodrigues e Marcia Rosa de Oliveira (Orientadora).

Ao final da pesquisa, solicitamos enviar ao CEP/HULW, uma cópia desta certidão e da pesquisa, em CD, para emissão da certidão para publicação científica.

João Pessoa, 26 de outubro de 2011.

Iaponira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - CEP/HULW

Profª Drª Iaponira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787
e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.



Questionário

Data: _____

Casos de pacientes do Hospital universitário Lauro Wanderley (HU), com suspeita de leishmaniose.

Nome:

Idade: _____

Enderreço: _____

Atividade

profissional: _____

Rg: _____

Diagnostico clínico

1. Quantas lesões? _____

a. Localização? _____

b. Ulceradas? _____

c. Atingiu a mucosa?

2. Características da lesão:

- a. Lesão dolorida
- b. Indolor
- c. Coceira/ardência
- d. Ausência de coceira
- e. Exsudação

3. Há quanto tempo apareceu a lesão?

4. Fez diagnóstico parasitológico antes de chegar no HU? Sim_____ Não_____

- a. Quais?_____

5. Fez algum tipo de tratamento recente antes de chegar ao HU ? Sim_____ Não_____

- a. Quais?_____

- b. Resultados?_____

- c. Droga utilizada?_____

6. Acometido anteriormente de lesões? Sim_____ Não_____

- a. Onde?_____

- b. A quanto tempo?_____

- c. Submetido a tratamento? Sim_____ Não_____

- d. Droga utilizada?_____

7. Outros tipos de doenças diagnosticado? Sim_____ Não_____

- a. Quais? _____

- b. Foram Tratados? _____

8. Outros quadros clínicos apresentados/relatados pelo paciente:

- a. Perda de peso?_____

- b. Febre?_____

- c. Outros?_____

Diagnostico epidemiológico

9. Local de residência:

- a. Cidade Sim_____ Não_____
- b. Campo Sim_____ Não_____

10. Rede de esgoto? Sim_____ Não_____

11. Quantas pessoas residem na casa? _____

- a. Quantos trabalham fora de casa? _____
- b. Que tipo de atividade profissional exercem? _____

12. Casos de leishmaniose na família? Sim_____ Não_____

- a. Quem?
- Pai? _____ Mãe? _____ Filhos? _____ Irmãos? _____ Cônjuge? _____ Outros parentes? _____
- b. Que tipo? _____
- c. Tratados? _____

13. Casos de leishmaniose na comunidade?

- a. Muitos casos? Sim_____ Não_____
- b. Que tipo? Sim_____ Não_____

3.1 Outras características/observações
